

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLÜSSE VON
PIMECROLIMUS UND TRIAMCINOLONACETONID
AUF DIE EPIDERMALHAUTBARRIERE
BEI ATOPISCHER DERMATITIS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MERLE WEPPNER

aus Brunsbüttel

Kiel 2014

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. E. Proksch
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. S. Nikolaus

Tag der mündlichen Prüfung:	14.01.2016
-----------------------------	------------

Zum Druck genehmigt, Kiel, den	14.01.2016
--------------------------------	------------

gez. Prof. Dr. J. Roider
(Vorsitzender des Promotionsausschusses)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	4
2.1	Studienprotokoll	4
2.1.1	Design der Studie	4
2.1.2	Probanden.....	4
2.1.3	Studienmedikation.....	5
2.1.4	Studienvisiten	6
2.2	Klinische Parameter.....	7
2.2.1	Läsionsgröße	7
2.2.2	„partial Eczema Area and Severity Index” (pEASI).....	7
2.2.3	Pruritus	7
2.2.4	Creme-Verbrauch	7
2.3	Biophysikalische Parameter	8
2.3.1	Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	8
2.3.2	Hauthydratation.....	8
2.3.3	Integrität des Stratum corneum	9
2.4	Stanzbiopsien.....	9
2.4.1	Entnahme der Stanzbiopsien	9
2.4.2	Aufarbeitung für die Lichtmikroskopie.....	10
2.4.3	Aufarbeitung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie	13
2.4.4	Auswertung der Lichtmikroskopie.....	14
2.4.5	Auswertung der Transmissions-Elektronenmikroskopie	15
2.5	Endpunkte der Studie.....	16
2.6	Statistik	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Klinische Parameter.....	17
3.1.1	Läsionsgröße	17
3.1.2	„partial Eczema Area and Severity Index” (pEASI).....	18
3.1.3	Pruritus	18
3.1.4	Creme-Verbrauch	19
3.2	Biophysikalische Parameter	20

3.2.1	Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	20
3.2.2	Hauthydration	22
3.2.3	Integrität des Stratum corneum	23
3.3	Parameter der epidermalen Proliferation	24
3.3.1	Dicke der Epidermis	24
3.3.2	Immunhistochemische Färbung auf Ki-67	25
3.3.3	Immunhistochemische Färbung auf Cytokeratin 16	27
3.4	Parameter der epidermalen Differenzierung	28
3.4.1	Immunhistochemische Färbung auf Filaggrin	28
3.4.2	Immunhistochemische Färbung auf Loricrin	30
3.4.3	Immunhistochemische Färbung auf Involucrin	31
3.5	Lamellenkörperchen	33
4	Diskussion	36
4.1	Klinische Parameter	36
4.2	Biophysikalische Parameter	38
4.3	Parameter der epidermalen Proliferation	41
4.4	Parameter der epidermalen Differenzierung	42
4.5	Lamellenkörperchen	47
4.6	Ausblick und klinische Implikationen	50
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	55
7	Anhang	58
7.1	Puffer und Chemikalienlösungen	58
7.1.1	Tris buffered saline (TBS)	58
7.1.2	Karnovsky Lösung	58
7.1.3	20% Paraformaldehydlösung	58
7.1.4	Osmiumtetroxid	58
7.1.5	EPON 812	58
7.1.6	Uranylacetat	59
7.1.7	Bleicitrat	59
8	Danksagung	60
9	Curriculum vitae	61

Glossarium

HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
LK	Lamellenkörperchen
MW	Mittelwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pEASI	„partial Eczema Area and Severity Index“
PIM	1 % Pimecrolimus Creme
SC	Stratum corneum
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SG	Stratum granulosum
TBS	Tris buffered saline
TCA	0,1 % Triamcinolonacetonid Creme
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEWL	transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss)

1 Einleitung

Die atopische Dermatitis – oder auch Neurodermitis oder atopisches Ekzem genannt – ist eine der bedeutendsten Hautkrankheiten in den westlichen Industrienationen, deren Prävalenz in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen ist. Derzeit leiden 10-20 % aller Kinder an einer atopischen Dermatitis (Leung und Bieber 2003). Die Ätiologie dieser Erkrankung ist bis heute nicht vollständig verstanden. Man kann allerdings davon ausgehen, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bestehend aus einer genetischen Prädisposition und verschiedenen Umwelteinflüssen (Morar et al. 2006). Zwei bisher bekannte Einflussgrößen sind eine veränderte immunologische Antwort auf Allergene oder mikrobiologische Keime sowie eine Störung der epidermalen Barrierefunktion (Proksch et al. 2006). Hierbei gibt es zwei verschiedene Hypothesen, wie diese beiden Einflussgrößen zusammen hängen (Elias und Feingold 2001): Bei der „outside-inside-Hypothese“ wird angenommen, dass eine gestörte epidermale Barriere eine vermehrte Penetration von Allergenen in die Haut ermöglicht und damit eine überschießende Immunantwort sowie eine epidermale Entzündungsreaktion triggert. Bei der „inside-outside-Hypothese“ wird ein inverser kausaler Zusammenhang angenommen: Am Anfang steht eine epidermale Entzündungsreaktion, die durch eine Fehlregulation des Immunsystems ausgelöst wurde und die im zweiten Schritt die epidermale Barrierefunktion beeinträchtigt. Bei beiden Modellen entwickelt sich allerdings gleichermaßen ein Circulus vitiosus aus gestörter Barrierefunktion, vermehrter Allergenpenetration und dysregulierter Immunreaktion mit epidermaler Entzündungsreaktion.

Die menschliche Epidermis wird in 4 Schichten eingeteilt. Hierbei unterscheidet man von basal nach superficial das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum sowie das Stratum corneum (Lüllmann-Rauch 2003). Die physikalische Barrierefunktion der Epidermis wird dabei vor allem durch die strukturellen Eigenschaften des Stratum corneum aufgebaut (Proksch et al. 2008). Sehr anschaulich ist hierbei der Vergleich des Stratum corneum mit einer Ziegelmauer: Die Ziegelsteine entsprechen dabei den Korneozyten, der Mörtel entspricht der lipidreichen Extrazellulärmatrix, die in Form von lamellaren Lipiddoppelschichten vorliegt (Elias 1983). Der Umwandlungs- oder Differenzierungsprozess der vitalen Keratinozyten zu avitalen Korneozyten am Stratum granulosum/Stratum corneum Übergang beginnt damit, dass im Zytoplasma Profilaggrin in mehrere Filaggrin-Monomere gespalten wird. Filaggrin wiederum vernetzt die vorhandenen Zytokeratinfilamente über

Disulfidbrücken zu einem unlöslichen Material, dem Keratin (Lüllmann-Rauch 2003). Daneben werden im Stratum granulosum spezielle Proteine – wie beispielsweise Loricrin und Involucrin – gebildet, die sich an der Innenseite der Plasmamembran ablagern und so das sogenannte „cornified envelope“ bilden (Lee et al. 2006). Das „cornified envelope“ ist auf der Innenseite mit dem Keratingerüst verbunden, nach außen wird es von einer dünnen Schicht spezialisierter Lipide umschlossen, dem sogenannten „cornified lipid envelope“ (Lee et al. 2006). „Cornified envelope“ und „cornified lipid envelope“ ersetzen zusammen die Plasmamembran der ehemaligen Keratinozyten (Lüllmann-Rauch 2003; Lee et al. 2006). Des Weiteren spielen beim Aufbau der epidermalen Barriere sogenannte Lamellenkörperchen eine zentrale Rolle. Dies sind kleine Zellorganellen, circa 200-300 nm im Längsdurchmesser, die im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum gebildet werden und die ihren Inhalt dann am Stratum granulosum/Stratum corneum Übergang durch Exozytose freisetzen (Lüllmann-Rauch 2003; Elias 1983). Die Lamellenkörperchen enthalten dabei hauptsächlich Glucosylceramide, Cholesterol und Phospholipide (Lee et al. 2006). Daneben werden aus den Lamellenkörperchen auch hydrolytische Enzyme freigesetzt, die dann für eine Spaltung der oben genannten Substanzen in Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol sorgen. Diese drei Hauptbestandteile bilden die lamellaren Lipiddoppelschichten des Stratum corneum (Lee et al. 2006).

Der Ansatzpunkt der aktuell gebräuchlichen Therapien der atopischen Dermatitis im akuten Schub ist meist eine Immunsuppression, um die epidermale Entzündungsreaktion zu unterdrücken. Hier kommen vor allem topisch angewendete Steroide zum Einsatz. Seit 2002 sind daneben auch topisch angewendete Calcineurin-Inhibitoren wie Tacrolimus und Pimecrolimus in Europa zugelassen, welche man bisher systemisch angewendet aus der Transplantationsmedizin kannte.

Betrachtet man die bisherigen Hypothesen zur Ätiologie der atopischen Dermatitis, so stellt sich die Frage, ob die bekannten topischen Therapien nur über eine Immunsuppression wirksam sind oder ob diese auch direkt Einfluss auf den Aufbau und die Funktion der epidermalen Barriere nehmen. Zur Klärung dieser Frage wurden in der Vergangenheit bereits Untersuchungen durchgeführt. Unter anderem wurden transmissions-elektronenmikroskopisch die oben beschriebenen Lamellenkörperchen untersucht (Jensen et al. 2009). Hierbei wurden Hautproben von Probanden mit atopischer Dermatitis vor sowie

nach dreiwöchiger Behandlung mit Pimecrolimus bzw. Betamethason untersucht. Lamellenkörperchen wurden für die weitere Auswertung als physiologisch eingestuft, wenn sie morphologisch mehr als 50 % lamellaren Inhalt enthielten. Es zeigten sich große Unterschiede zwischen gesunder und atopischer Haut sowie im Falle der atopischen Haut vor und nach Behandlung. Läsionale Haut bei atopischer Dermatitis wies nur 13 % physiologische Lamellenkörperchen auf, wohingegen bei gesunder Haut circa 91 % physiologische Lamellenkörperchen beobachtet wurden. Nach Behandlung mit Betamethason, einem hoch-potenten topischen Steroid, blieb diese Zahl fast unverändert bzw. sank sogar noch etwas weiter ab auf etwa 9 %. Dahingegen konnten nach Behandlung mit Pimecrolimus circa 82 % physiologische Lamellenkörperchen beobachtet werden, was der Zahl bei Hautgesunden schon sehr nahe kam (Jensen et al. 2009). Aufgrund der kleinen Stichprobenzahl von $n = 3$ konnte diese Beobachtung jedoch nur eingeschränkt für eine allgemeingültige Aussage benutzt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte an einer größeren Stichprobenzahl untersucht werden, ob sich durch eine Therapie mit Pimecrolimus eine Erhöhung des Anteils physiologischer Lamellenkörperchen bei atopischer Dermatitis bestätigen ließ. Dazu wurde eine randomisierte, intraindividuelle und doppelblinde Studie an insgesamt fünfzehn Probanden durchgeführt. Statt dem hoch-potenten Steroid Betamethason wurde in diesem Fall ein mittel-potentes Steroid verwendet, um eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse in den klinischen Alltag zu gewährleisten. Neben den Lamellenkörperchen wurde an den gewonnenen Hautbiopsien auch untersucht, ob die beiden Therapien relevante Effekte auf die epidermale Differenzierung und Proliferation zeigten. Nicht zuletzt wurden auch mögliche Einflüsse auf biophysikalische Parameter der epidermalen Barrierefunktion und klinische Wirksamkeit der Therapien mitbeurteilt.

2 Material und Methoden

2.1 Studienprotokoll

2.1.1 Design der Studie

Die vorliegende Arbeit wurde als randomisierte, intraindividuelle und doppelblinde Studie durchgeführt. Über einen Zeitraum von drei Wochen behandelten hierzu fünfzehn erwachsene Probanden mit atopischer Dermatitis jeweils ihren rechten und linken Arm zweimal täglich mit 1 % Pimecrolimus Creme (PIM) bzw. 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme (TCA). Die Probanden wurden dabei den beiden Behandlungsgruppen zufällig zugeteilt (acht Probanden mit PIM links/TCA rechts, sieben Probanden mit TCA links/PIM rechts).

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (EudraCT-No. 2007-003106-99) genehmigt.

2.1.2 Probanden

Die Probanden wurden aus dem Patientengut der Neurodermitis-Ambulanz der Universitäts-Hautklinik Kiel, aus Studenten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Personen aus deren privaten Umfeld rekrutiert. Es wurden sieben weibliche und acht männliche Probanden in die Studie eingeschlossen. Kein Proband brach die Studie vorzeitig ab. Der Mittelwert des Alters der Probanden lag zum Zeitpunkt ihrer Studienteilnahme bei 29 Jahren, wobei die absoluten Werte zwischen 20 und 44 Jahren lagen.

Die Probanden mussten entsprechend den Einschlusskriterien mindestens 18 Jahre alt sein, eine atopische Dermatitis musste nach den Kriterien von Hanifin und Rajka diagnostiziert sein und die Ausprägung sollte in der Vorgeschichte leicht bis mittelschwer sein. Bei Studienbeginn musste ein Befall der oberen Extremitäten von jeweils mindestens zehn Prozent ihrer Oberfläche – ausgenommen der Hände – vorliegen. An jeder Extremität wurde eine möglichst gleich große und für die Erkrankung repräsentative Zielläsion festgelegt. Diese Zielläsion musste einen Score-Wert entsprechend des „partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI) zwischen drei und acht aufweisen und durfte zwischen dem rechten und linken Arm um nicht mehr als einen Punkt differieren. Außerdem durfte die Zielläsion keine Zeichen einer Hautatrophie oder eines Steroidschadens aufweisen. Daneben wurde auch ein Areal nicht-läsionaler Haut für die weiteren Untersuchungen festgelegt. Für die Dauer der

Studie durften die oberen Extremitäten ausschließlich mit der Studienmedikation behandelt werden. Die Behandlung der Hände war dabei ausgeschlossen, um Vermischungen der beiden Medikamente zu verhindern. Den übrigen Körper durften die Probanden lediglich mit rückfettenden Pflegecremes behandeln. Eine topische Therapie mit Steroiden, Tacrolimus oder Pimecrolimus musste vor Studienbeginn mindestens sieben Tage zurückliegen, sofern sie die oberen Extremitäten oder mehr als 20 % der übrigen Körperoberfläche betraf. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine systemische Therapie mit nachgewiesenem oder vermutetem Effekt auf atopische Dermatitis für die Dauer der Studie und bis zu vierzehn Tage davor. Dazu zählte auch eine Bestrahlungstherapie. Lediglich dauerhaft eingenommene und niedrig dosierte inhalative Beta-Agonisten oder inhalative bzw. nasal applizierte Steroide waren als begleitende Therapien gestattet. Auch dauerhaft eingenommene, orale Antihistaminika durften weiterhin eingesetzt werden. Ausschlusskriterien speziell für Frauen waren Schwangerschaft und Stillzeit sowie eine medizinisch unzureichend sichere Kontrazeption für den Zeitraum der Studie und bis zu vier Wochen darüber hinaus. Immunsupprimierte, Personen mit einer akuten viralen Infektion der Haut oder mit unzureichender Compliance waren allgemein ausgeschlossen. Die Teilnahme an einer anderen Studie in den vorausgegangenen acht Wochen und in der Zeit der Durchführung dieser Studie stellte ein weiteres Ausschlusskriterium dar.

2.1.3 Studienmedikation

Hierbei handelte es sich um 1 % Pimecrolimus Creme (Elidel® 1 % Creme, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) sowie 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme (Triamgalen® Creme, GALENpharma GmbH, Kiel). Die beiden Präparate wurden durch die Klinikapotheke des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel in äußerlich identische Tuben à 30 g Creme abgefüllt und mit einem Etikett versehen, das neben allgemein vorgeschriebenen Hinweisen die Randomisierungsnummer und die Aufschrift „Rechter bzw. Linker Arm“ enthielt. Die beiden Cremes glichen sich zudem in Farbe, Konsistenz und Geruch.

Zu Beginn der Studie wurden die Probanden in der Anwendung der Studienmedikation angeleitet. Zum Bemessen der verwendeten Creme-Menge sollte die Maßeinheit der „Finger-Tip Unit“ (Long und Finlay 1991) verwendet werden. Bis zu vier „Finger-Tip Units“ durften pro Extremität verwendet werden. Dabei sollte als erstes die Zielläsion behandelt werden, dann weitere läsionale Haut außerhalb der Zielläsion und zum Schluss das vorher definierte Areal nicht-läsionaler Haut. Sofort nach dem Auftragen der Studienmedikation, aber auch

nach der Verwendung jeglicher Pflegecreme am übrigen Körper, waren die Probanden angehalten sich gründlich die Hände zu waschen um eine Kontamination der oberen Extremitäten zu verhindern. Diese definierte Anwendung der Studienmedikation sollte über die gesamte Studiendauer identisch durchgeführt werden, auch für den Fall, dass die Zielläsion eventuell im Verlauf der Studie komplett ekzempfrem wurde. Für den Fall, dass ein Proband trotz dieses Vorgehens mehr als die initial verteilten 30 g Creme pro Präparat benötigte, war es möglich einen zweiten Satz Studienmedikation über die Klinikapotheke zu erhalten, ohne dass es zu einer vorzeitigen Entblindung kam.

2.1.4 Studienvisiten

Vor Beginn der eigentlichen Studie fand zunächst eine Screening Phase statt. In dieser wurden Probanden, die den Einschlusskriterien entsprachen, gesucht. Bei diesen wurde dann eine Kranken- und Medikamentenanamnese erhoben, eine körperliche Untersuchung durchgeführt, mögliche Ausschlusskriterien überprüft (inklusive eines Schwangerschaftstests bei Frauen) sowie eine ausführliche Aufklärung über die Studie durchgeführt. Falls eine Therapie bestand, die eine Teilnahme an der Studie ausgeschlossen hätte, wurde diese beendet und vor Studienbeginn die vorgeschriebene Karenzzeit eingehalten.

Die eigentliche Studie umfasste drei Visiten: eine Basisvisite an Tag 1 vor Beginn der Behandlung und zwei Folgevisiten an Tag 8 und 22. Die vorgenommenen Untersuchungen an den einzelnen Visiten fasst Tabelle 1 zusammen.

Tab. 1: Behandlungsplan der Studienvisiten an Tag 1, 8 und 22

	Tag 1	Tag 8	Tag 22
Läsionsgröße	X	X	X
„partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI)	X	X	X
Pruritus	X	X	X
Creme-Verbrauch			X
Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	X	X	X
Hauthydratation	X	X	X
Integrität des Stratum corneum	X		X
Stanzbiopsie(n)	X		X

2.2 Klinische Parameter

2.2.1 Läsionsgröße

Hierbei wurde bewertet, wie viel Prozent der Oberfläche einer oberen Extremität von atopischer Dermatitis betroffen waren. Unter Ausschluss der Hände wurden linker und rechter Arm jeweils getrennt an Tag 1, 8 und 22 bewertet. Zur Abschätzung der prozentualen Oberfläche galt als individueller Richtwert, dass die Handfläche inklusive der Finger circa zehn Prozent der Oberfläche einer oberen Extremität entsprach.

2.2.2 „partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI)

Um den Schweregrad der Erkrankung und vor allem einen Therapieerfolg genauer beurteilen zu können, wurde an Tag 1, 8 und 22 jeweils getrennt für den rechten und linken Arm an der vorher definierten Zielläsion der „partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI) bestimmt. Hierbei handelte es sich um eine verkürzte Variante des in der Klinik gebräuchlichen „Eczema Area and Severity Index“ (EASI). Zur Bestimmung des pEASI wurden die vier Parameter Erythem, Infiltration, Exkoration und Lichenifikation beurteilt. Für jeden Parameter wurde dabei ein Punktwert von null (Kriterium liegt nicht vor), eins (Kriterium ist leicht ausgeprägt), zwei (Kriterium ist mäßig ausgeprägt) oder drei (Kriterium ist stark ausgeprägt) vergeben und anschließend die Summe der vier Einzelwerte gebildet. Damit konnte der pEASI Werte zwischen null und zwölf annehmen.

2.2.3 Pruritus

Die Stärke des Juckreizes wurde täglich anhand einer visuellen Analogskala ermittelt und mithilfe eines Tagebuches dokumentiert. Dabei entsprach ein Wert von null einem Fehlen von Juckreiz und ein Wert von zehn dem maximal vorstellbaren Juckreiz. Es wurde der Juckreiz am rechten und linken Arm getrennt und unter Abschätzung des gesamten Tages bewertet.

2.2.4 Creme-Verbrauch

Im Rahmen der letzten Studienvisite an Tag 22 wurden die benutzten Cremetuben der Probanden mit einer elektronischen Waage (SOEHNLE Küchenwaage „Bretagne“, Leifheit AG, Nassau) gewogen. Zur Bestimmung des Gewichtes des Verpackungsmaterials waren vor Studienbeginn mit der gleichen Waage zehn unbenutzte Cremetuben gewogen worden und ein Mittelwert gebildet worden. Von diesem Ausgangswert wurde dann das Gewicht der benutzten Tuben abgezogen und so ein Verbrauch errechnet.

2.3 Biophysikalische Parameter

2.3.1 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Dieser Parameter wurde mit dem Tewameter TM 210 (Courage und Khazaka electronic GmbH, Köln) ermittelt. Die Messungen fanden jeweils an der Zielläsion und dem vorher definierten Areal nicht-läsionaler Haut statt. Im Rahmen der Basisvisite an Tag 1 – also vor Behandlungsbeginn – wurde hierbei auf einen Seitenvergleich verzichtet und die Messungen nur an einer zufällig gewählten oberen Extremität durchgeführt (neun Probanden linker Arm, sechs Probanden rechter Arm). Im Rahmen der Folgevisiten an Tag 8 und 22 – also nach Behandlungsbeginn – wurde der TEWL natürlich an beiden oberen Extremitäten gemessen. Jede Messregion, zum Beispiel „läsionale Haut rechter Arm“ oder „nicht-läsionale Haut linker Arm“, wurde dabei dreimal gemessen. Hinterher wurde der Mittelwert der drei Einzelwerte gebildet.

Die physikalische Grundlage des Tewameters bildete das Fick'sche Diffusionsgesetz. Als Messsonde diente ein zu beiden Seiten offener Hohlzylinder, in dem sich zwei Sensorpaare befanden. Der Hohlzylinder wurde senkrecht auf die Haut aufgesetzt, so dass diese Seite von der Haut komplett verschlossen war. Das an der Hautoberfläche verdunstende Wasser trat durch den Zylinder aus, so dass eine näherungsweise homogene Diffusionszone angenommen werden konnte. Die beiden Sensorpaare maßen über Temperatur und relative Feuchte indirekt den dabei auftretenden Dichtegradienten (Dichteänderung je Weglängeneinheit). Ein Mikroprozessor errechnete mithilfe des Fick'schen Diffusionsgesetzes aus diesem Dichtegradienten den transepidermalen Wasserverlust und zeigte das Ergebnis digital in g/hm² an.

2.3.2 Hauthydratation

Die Messung der Hauthydratation erfolgte mit dem Corneometer CM 820 (Courage und Khazaka electronic GmbH, Köln). Dabei wurden rechte und linke obere Extremität getrennt voneinander und jeweils im Bereich läsionaler sowie nicht-läsionaler Haut untersucht. Nur im Rahmen der Basisvisite an Tag 1 wurde analog zu dem Vorgehen beim transepidermalen Wasserverlust auf den Seitenvergleich verzichtet. Transepidermaler Wasserverlust und Hauthydratation wurden dabei stets an der gleichen oberen Extremität bestimmt. Auch bei der Bestimmung der Hauthydratation wurde jede Messregion dreimal gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet.

Für die Messungen wurde eine Messsonde auf die Haut aufgesetzt. Der Kopf dieser Messsonde war als Streufeldkondensator aufgebaut und gegenüber der Hautoberfläche isoliert. Die Wassermoleküle der oberen 10-20 μm des Stratum corneum erhöhten aufgrund ihrer dielektrischen Eigenschaft die Kapazität des Kondensators. Andere Moleküle der Haut hatten aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Dielektrizitätskonstanten kaum Einfluss auf die Kapazität des Kondensators. Die Kapazitätsänderung des Kondensators wurde digital in dimensionslosen Einheiten angezeigt, wobei ein hoher Messwert einer großen Kapazitätsänderung und damit einer hohen Hauthydratation entsprach.

2.3.3 Integrität des Stratum corneum

Die Integrität des Stratum corneum wurde nur in dem vorher definierten Areal nicht-läsionaler Haut gemessen. Auch bei diesem biophysikalischen Parameter wurde im Rahmen der Basisvisite an Tag 1 auf einen Seitenvergleich verzichtet und die Messung an jener oberen Extremität durchgeführt, die auch schon zur Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes und der Hauthydratation gedient hatte. Im Rahmen der Folgevisite an Tag 8 fand keine Messung der Integrität statt, so dass erst nach Ende der Behandlung an Tag 22 eine Messung im Seitenvergleich durchgeführt wurde.

Die Integrität des Stratum corneum wurde indirekt durch sogenanntes „tape-stripping“ gemessen. Dabei wurden repetitiv 5 cm lange und 19 mm breite tesafilm® transparent-Streifen (tesa AG, Hamburg) auf die Testregion aufgebracht und rasch wieder abgezogen. Dies wurde solange wiederholt bis die Hautbarriere derart gestört war, dass der transepidermale Wasserverlust (gemessen mit dem Tewameter TM 210, Courage und Khazaka electronic GmbH, Köln) auf Werte über 30 g/hm^2 stieg. Die Anzahl der benötigten tesafilm® Streifen wurde dann als Parameter für die Integrität des Stratum corneum verwendet.

2.4 Stanzbiopsien

2.4.1 Entnahme der Stanzbiopsien

Die Stanzbiopsien wurden stets aus der Zielläsion entnommen. Im Rahmen der Basisvisite an Tag 1 – also vor Behandlungsbeginn – wurde nur aus einer oberen Extremität eine Biopsie entnommen. Dabei wurde jene obere Extremität gewählt, an der auch schon die biophysikalischen Parameter bestimmt wurden. Nach Abschluss der dreiwöchigen Behandlung mit 1 % Pimecrolimus Creme (PIM) und 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme (TCA) wurden dann aus beiden oberen Extremitäten Biopsien entnommen.

Unter einer lokalen Hautanästhesie (Prilocainhydrochlorid + Epinephrinhydrogentartrat, Xylonest® 2 % mit Adrenalin 1:200000, Astra Zeneca GmbH, Wedel) wurde die Hautprobe mit einer 5 mm Biopsiestanze (pfm – Produkte für die Medizin AG, Köln) gewonnen. Die entstandene Wunde wurde mit einem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial (Resolon®, 4/0 USP, Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg) mithilfe zweier Einzelknopfnähte versorgt. Die Fäden wurden zehn Tage nach Biopsieentnahme entfernt.

Der entnommene Hautzylinder wurde direkt nach der Entnahme mit einem Skalpell (Disposable scalpel No. 23, Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan) halbiert. Die Fixierung erfolgte für die Lichtmikroskopie über Nacht bei Raumtemperatur in 5 % Formalin, für die Transmissions-Elektronenmikroskopie in einer modifizierten Karnovsky Lösung (Microscopy Services® Dähnhardt GmbH, Flintbek) bei 4 °C ebenfalls über Nacht.

2.4.2 Aufarbeitung für die Lichtmikroskopie

2.4.2.1 Chemikalien, Biochemikalien und Puffer

Finden sich im fortlaufenden Text keine näheren Angaben zu den Chemikalien und Biochemikalien, so stammen diese von den Firmen Merck KGaA, Darmstadt und Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München.

Für detaillierte Hinweise zur Herstellung der verwendeten Puffer siehe Anhang.

2.4.2.2 Vorbereitung der Präparate für die Färbungen

Nach der Formalinfixierung wurden die Präparate im Tissue-Tek® VIP® (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, California, USA) entwässert und paraffiniert: 2 Minuten 10 % Formalin, 60 Minuten 50 % Ethanol, 60 Minuten 60 % Ethanol, 60 Minuten 70 % Ethanol, 30 Minuten 96 % Ethanol, 60 Minuten 96 % Ethanol, 90 Minuten Isopropanolol absolut, 120 Minuten Isopropanolol absolut, 90 Minuten Xylol, 90 Minuten Xylol, 30 Minuten Xylol, 30 Minuten Paraffin flüssig, 60 Minuten Paraffin flüssig, 60 Minuten Paraffin flüssig. Anschließend wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und tiefgeköhlt. Aus den fertigen Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom (Jung AG, Heidelberg) 3-5 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus, Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) gezogen und für 40 Minuten bei 60 °C im Wärmeschränk getrocknet.

2.4.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hierfür wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert, indem sie je zweimal für jeweils 2 Minuten in folgende Bäder getaucht wurden: Xylol, Ethanol absolut, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, Aqua destillata. Für die eigentliche Färbung wurden die Schnitte wie folgt behandelt: 6 Minuten Gill III (Shandon GmbH, Frankfurt am Main), 10 Sekunden Eisessigwasser (5 ml Eisessig ad 1000 ml Aqua destillata), 10 Sekunden Aqua destillata, 6 Minuten mit Leitungswasser spülen. Die Gegenfärbung erfolgte für 1 Minute mit Eosinalkohol (1 g Eosin gelblich ad 1000 ml 96 % Ethanol, 10 ml Eisessig). Abschließend wurden die Schnitte für jeweils 8 Sekunden folgendermaßen gespült: einmal 70 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol, dreimal Ethanol absolut, zweimal Ethanol-Xylol (Verhältnis 1:1), fünfmal Xylol. Zum Schluss wurden die Präparate mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

2.4.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Es wurden immunhistochemische Färbungen für den Proliferationsmarker Ki-67, für das proliferations-assoziierte Cytokeratin 16 und für die Differenzierungsmarker Filaggrin, Loricrin und Involucrin durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Schnitte ebenfalls entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden sie je zweimal in folgende Bäder getaucht: 5 Minuten Xylol, 1 Minute Ethanol absolut, 1 Minute 96 % Ethanol, 1 Minute 70 % Ethanol, Aqua destillata. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 5 Minuten mit 3 % H_2O_2 inkubiert und anschließend mit Aqua destillata gespült.

Als Vorbereitung für die spätere Antikörper-vermittelte Färbung (außer bei Involucrin) wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 für 30 Minuten im 90 °C Wasserbad erhitzt. Nach dem Kochvorgang kühlten die Schnitte für weitere 30 Minuten in dem Citratpuffer ab, bevor sie nach kurzem Spülen in Aqua destillata für 5 Minuten in Tris buffered saline (TBS) gestellt wurden. Bei der Färbung auf Involucrin wurde eine andere Methode der Vorbereitung für die spätere Antikörper-vermittelte Reaktion verwendet. Hier erfolgte bei Raumtemperatur für 6 Minuten eine Inkubation mit Proteinase K (Dako Deutschland GmbH, Hamburg). Nach kurzem Spülen in Aqua destillata wurden auch diese Schnitte dann für 5 Minuten in ein TBS-Bad gestellt.

Färbungen auf Ki-67, Cytokeratin 16, Filaggrin und Involucrin:

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation mit Normal-Kaninchenserum (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) 1:5 verdünnt in TBS. Nach Entfernung des Normal-Kaninchensersums wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem jeweiligen primären Nachweis-Antikörper, verdünnt in TBS, inkubiert. In diesem Fall handelte es sich um monoklonale Maus-Antikörper (Anti-Ki-67: 1:75 verdünnt, Acris Antibodies GmbH, Herford; Anti-Cytokeratin 16: 1:50 verdünnt, Acris Antibodies GmbH, Herford; Anti-Filaggrin: 1:75 verdünnt, Abcam plc, Cambridge, UK; Anti-Involucrin: 1:150 verdünnt, Acris Antibodies GmbH, Herford). Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten mit TBS erfolgte für 30 Minuten die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, einem biotinylierten Kaninchen-Antikörper gegen Maus-Immunglobulin (Dako Deutschland GmbH, Hamburg), der 1:250 in TBS verdünnt wurde. Es folgten wiederum drei Spülgänge à 5 Minuten mit TBS. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem strept-AB-Complex/HRP (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Dieser Komplex enthielt das tetravalente Biotin-bindende Streptavidin sowie biotinylierte Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase - HRP). Streptavidin fungierte dabei als Bindeglied zwischen den biotinylierten Sekundär-Antikörpern und den biotinylierten Meerrettichperoxidase-Komplexen (Eckert und Kartenbeck 1997). Nach weiteren drei Spülgängen à 5 Minuten mit TBS wurde die Nachweisreaktion durch Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin (BioGenex Laboratories Inc, Fremont, California, USA) und H_2O_2 ausgelöst. Für die Reagenzlösung wurden 2,25 ml Aqua destillata, 0,25 ml zehnfach konzentriertes TBS, 2 Tropfen Diaminobenzidin und 1 Tropfen H_2O_2 gemischt. In der Nachweisreaktion wandelte die Meerrettichperoxidase H_2O_2 in H_2O um und oxidierte dabei das ursprünglich farblose Chromogen Diaminobenzidin zu seinem braunen Endprodukt. Die Färbereaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach 5-15 Minuten durch Abspülen des Chromogens mit Aqua destillata beendet. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Mayers Häm Alaun-Lösung für 15 Sekunden. Zum Schluss wurde erneut mit Aqua destillata und abschließend für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Schnitte mit Glycergel® Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) eingedeckt.

Färbung auf Loricrin:

Bei dieser Färbung wurde als primärer Nachweis-Antikörper ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet (Anti-Loricrin: 1:500 verdünnt in TBS, Covance Inc., Princeton, New

Jersey, USA). Daraus ergaben sich im Vergleich zu dem oben beschriebenen Vorgehen folgende Veränderungen: Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Inkubation für 30 Minuten mit Normal-Schweineserum (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) 1:20 verdünnt in TBS; als Sekundär-Antikörper wurde ein biotinylierter Schweine-Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) – 1:500 in TBS verdünnt – verwendet. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu den oben beschriebenen Färbungen.

2.4.3 Aufarbeitung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie

2.4.3.1 Chemikalien und Chemikalienlösungen

Alle verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München und Plano GmbH, Wetzlar.

Für detaillierte Hinweise zur Herstellung der verwendeten Chemikalienlösungen siehe Anhang.

2.4.3.2 Fixierung und Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte durch die Microscopy Services® Dähnhardt GmbH.

Die Fixierung der Proben wurde durch die oben beschriebene Lagerung in der modifizierten Karnovsky Lösung (Microscopy Services® Dähnhardt GmbH, Flintbek) bei 4 °C über Nacht begonnen. Für die weitere Aufarbeitung wurden die Proben zweimal für jeweils 10 Minuten mit 0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer mit einem pH-Wert von 7,3 gespült. Für die weitere Fixierung wurde bei Raumtemperatur mit Osmiumtetroxid für 60 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Spülen für jeweils 5 Minuten in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH-Wert 7,3) erfolgte die Entwässerung der Proben: zweimal 10 Minuten Ethanol 50 %, zweimal 10 Minuten Ethanol 70 %, zweimal 5 Minuten Ethanol 95 %, viermal 20 Minuten Ethanol absolut. Die Einbettung der Proben erfolgte nach folgendem Schema: zweimal 5 Minuten Propylenoxid, einmal 60 Minuten EPON 812/Propylenoxid (1:1), einmal 60 Minuten EPON 812/Propylenoxid (2:1), zweimal 60 Minuten EPON 812, Einbettung in die Formen mit Bezeichnung. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 60°C. Zur Anfertigung der Ultradünnschnitte von 60-70 nm Dicke wurde das Ultracut S (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) mit einem Diamantmesser (2,1 mm, 45°) (Diatome AG, Biel, Schweiz) verwendet. Die Schnitte wurden auf unbefilmte Kupfer-Grids (Plano GmbH, Wetzlar)

gezogen. Die Nachkontrastierung erfolgte durch Inkubation der Schnitte für 3 Minuten mit Uranylacetat und abschließend für 5 Minuten mit Bleicitrat.

2.4.4 Auswertung der Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Auswertung der Hautbiopsien erfolgte mit dem Axioskop 40 (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Die Präparate wurden mit der AxioCam HRc (Carl Zeiss AG, Oberkochen) unter Verwendung der Gerätesoftware fotografiert und digital gespeichert.

Alle folgenden lichtmikroskopischen Auswertungen wurden von zwei voneinander unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Für die endgültige statistische Auswertung wurde der Mittelwert der Ergebnisse der beiden Untersucher verwendet.

2.4.4.1 Dicke der Epidermis

Zur Messung der Dicke der Epidermis wurden die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparate, eine Strichkreuzmikromete (W-PI 10x/23, Carl Zeiss AG, Oberkochen) als Okular sowie ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung verwendet. Die Dicke der Epidermis wurde pro Präparat an drei unterschiedlichen Stellen gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet.

2.4.4.2 Ki-67

Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität der Gewebe wurden sie immunhistochemisch auf Ki-67 angefärbt. Unter Verwendung eines Objektivs mit 40-facher Vergrößerung wurden dafür die angefärbten Zellkerne pro Gesichtsfeld gezählt. Für die statistische Auswertung wurde jeweils der Mittelwert dreier Gesichtsfelder gebildet.

2.4.4.3 Cytokeratin 16, Filaggrin, Loricrin und Involucrin

Zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen auf Cytokeratin 16, Filaggrin, Loricrin und Involucrin wurde jeweils ein Vier-Punkte-Score mit Werten zwischen null und drei verwendet. Die detaillierten Kriterien zur Vergabe der einzelnen Punktwerte werden von Tabelle 2, 3 und 4 zusammengefasst. Auch halbe Punkte konnten vergeben werden. Es wurde stets ein repräsentativer Gesamteindruck des Präparates bewertet.

Tab. 2: Punkte-Score für Cytokeratin 16

0	Keine Anfärbung
1	Einzelne Zellen gefärbt oder Stratum granulosum gefärbt
2	Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum gefärbt
3	Stratum granulosum und Stratum spinosum komplett gefärbt

Tab. 3: Punkte-Score für Filaggrin und Loricrin

0	Keine Anfärbung
1	Anfärbungslinie weist Lücken auf
2	Breite Anfärbungslinie zwischen Stratum granulosum und corneum
3	Schmale Anfärbungslinie zwischen Stratum granulosum und corneum

Tab. 4: : Punkte-Score für Involucrin

0	Keine Anfärbung
1	Stratum granulosum gefärbt
2	Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum gefärbt
3	Stratum granulosum und spinosum komplett gefärbt, teilweise bis Stratum basale

2.4.5 Auswertung der Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die transmissions-elektronenmikroskopische Auswertung der Hautbiopsien erfolgte ebenfalls durch die Microscopy Services® Dähnhardt GmbH. Hierzu wurden das TEM 910 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) und das TEM 301 (FEI Company, Eindhoven, Niederlande) verwendet. Die vorliegenden Fotos wurden auf dem Filmmaterial SO 163 (Kodak GmbH, Genf, Schweiz) entwickelt und mit einem Scanner (Epson America, Inc., Long Beach, California, USA) unter Verwendung der Gerätesoftware digitalisiert.

In den Hautbiopsien wurden die Lamellenkörperchen des Stratum granulosum/Stratum corneum Übergangs in jeweils zehn Gesichtsfeldern analysiert. Es wurde bei jedem einzelnen Lamellenkörperchen beurteilt, ob es mindestens 50 % lamellare Struktur enthielt. War dies der Fall, so wurde es als physiologisches Lamellenkörperchen gewertet. Für die statistische Auswertung der Daten wurde der Prozentsatz physiologischer Lamellenkörperchen verwendet.

2.5 Endpunkte der Studie

2.5.1.1 Primärer Endpunkt

Das primäre Untersuchungsziel der Studie war die Frage, ob der Prozentsatz physiologischer Lamellenkörperchen nach dreiwöchiger Behandlung mit 1 % Pimecrolimus Creme höher war als nach dreiwöchiger Behandlung mit 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme.

2.5.1.2 Sekundäre Endpunkte

Als sekundäre Endpunkte wurden die Effekte der beiden Therapien auf klinische Parameter (Läsionsgröße, pEASI und Pruritus), auf biophysikalische Parameter (TEWL, Hauthydratation und Integrität des Stratum corneum) sowie auf Parameter der epidermalen Proliferation (Dicke der Epidermis, Ki-67 und Cytokeratin 16) und Differenzierung (Filaggrin, Loricrin und Involucrin) untersucht.

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung des primären Endpunktes wurde der ungepaarte, einseitige Student's t-Test verwendet. Zur statistischen Auswertung der sekundären Endpunkte wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test verwendet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Soweit nicht gesondert vermerkt, wurde in den Graphiken der Mittelwert mit dem Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Parameter

3.1.1 Läsionsgröße

Ein Einschlusskriterium der Studie war ein symmetrischer Befall beider oberer Extremitäten. Entsprechend zeigten sich an Tag 1 vor Beginn der Behandlung am rechten und linken Arm keine signifikanten Unterschiede in der Läsionsgröße (Abb. 1). Unter Behandlung sowohl mit 1 % Pimecrolimus Creme (PIM) als auch mit 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme (TCA) kam es zu einer Verkleinerung der Läsionsgröße im Vergleich von Tag 1 zu Tag 8 bzw. zu Tag 22. Diese Reduktion der Läsionsgröße fiel unter Behandlung mit TCA schneller aus und erwies sich zu beiden Zeitpunkten als statistisch signifikant (Tag 8: $p = 0,02$; Tag 22: $p < 0,0001$). Dahingegen war die Verkleinerung unter PIM statistisch nicht signifikant (Tag 22: $p = 0,051$). Am Ende der Studie an Tag 22 zeigte sich zudem eine signifikant höhere Reduktion der Läsionsgröße durch die Behandlung mit TCA im Vergleich zu der durch PIM ($p = 0,01$).

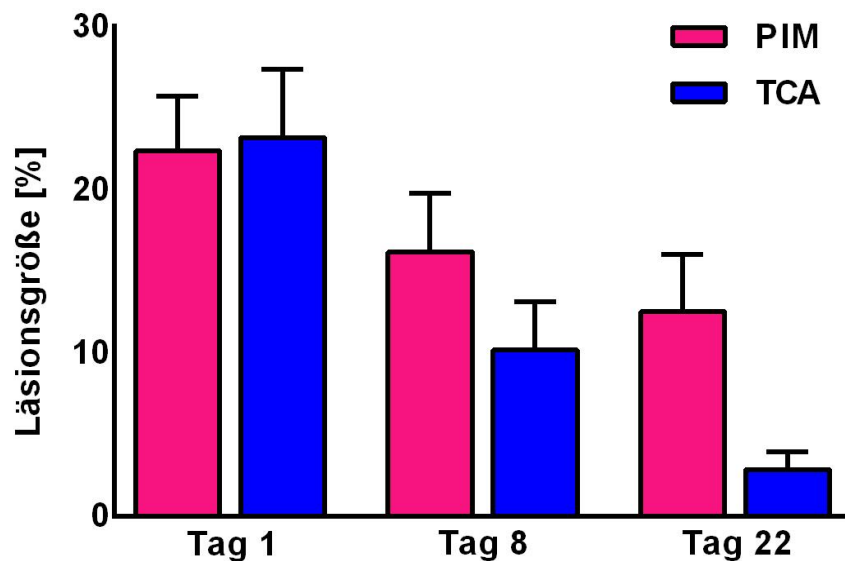


Abb. 1: Prozentsatz läsionaler Haut bezogen auf die Gesamtoberfläche der jeweiligen oberen Extremität vor Behandlung an Tag 1 und nach ein- bzw. dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Läsionsgröße unter TCA-Behandlung von Tag 1 zu Tag 8 bzw. zu Tag 22. Außerdem ließ sich eine signifikant höhere Reduktion unter Behandlung mit TCA an Tag 22 im Vergleich zur Behandlung mit PIM erkennen.

3.1.2 „partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI)

An Tag 1 zeigten sich entsprechend den Einschlusskriterien der Studie keine signifikanten Unterschiede bei der Erhebung des pEASI zwischen rechtem und linkem Arm (Abb. 2). Es zeigte sich analog zu den Ergebnissen der Läsionsgröße eine rasche und signifikante Besserung des pEASI von Tag 1 zu Tag 8 bzw. zu Tag 22 unter der Behandlung mit TCA (Tag 8: $p = 0,001$; Tag 22: $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu erreichte die Besserung des pEASI unter der PIM-Therapie keine statistische Signifikanz. Bei Vergleich der beiden Therapien miteinander konnte sowohl an Tag 8 als auch an Tag 22 eine signifikant stärkere Reduktion des pEASI durch TCA gezeigt werden (Tag 8: $p = 0,02$; Tag 22: $p = 0,0008$).

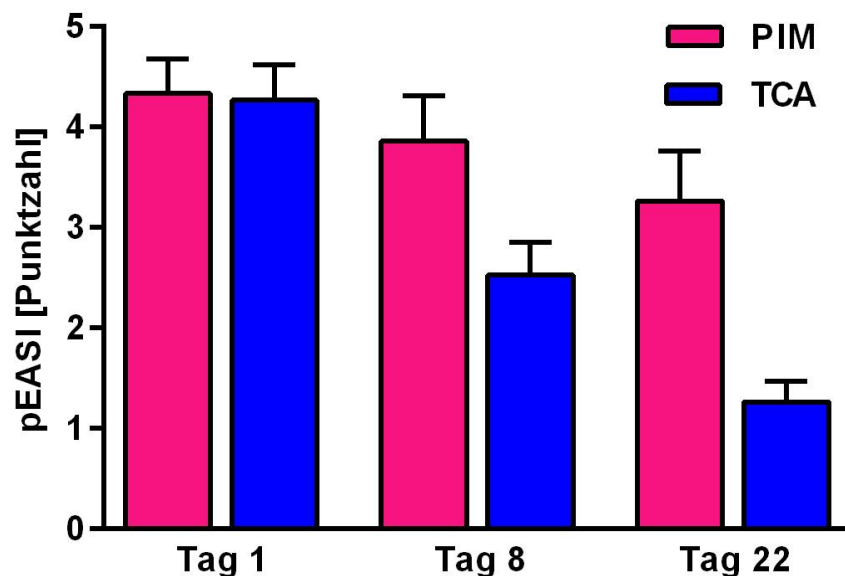


Abb. 2: Punktzahl des „partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI) vor Behandlung an Tag 1 und nach ein- bzw. dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA ($n = 15$ Probanden): Es ließ sich eine signifikante Reduktion des Score-Wertes unter TCA-Behandlung von Tag 1 zu Tag 8 bzw. zu Tag 22 erkennen. Außerdem zeigte sich eine signifikant höhere Reduktion des Scores durch die Behandlung mit TCA im Vergleich zur Behandlung mit PIM an Tag 8 und an Tag 22.

3.1.3 Pruritus

Der Pruritus wurde an jedem Tag im Studienverlauf mit einer visuellen Analogskala gemessen und in einem Patiententagebuch dokumentiert. Die statistische Auswertung erbrachte dabei eine signifikante Reduktion des Pruritus unter der Behandlung mit TCA im Vergleich zum unbehandelten Zeitpunkt (Tag 8: $p = 0,0001$; Tag 22: $p < 0,0001$) (Abb. 3). Unter der Behandlung mit PIM kam es in der ersten Behandlungswoche zu einer transienten, leichten Erhöhung des Pruritus über den unbehandelten Ausgangswert hinaus. In den weiteren

zwei Behandlungswochen kam es dann aber zu einer Reduktion des Pruritus. Beim statistischen Vergleich von Tag 1 zu Tag 22 zeigte sich unter der PIM-Behandlung ebenfalls eine signifikante Reduktion des Pruritus ($p = 0,0004$). Des Weiteren wurde die Reduktion des Pruritus unter TCA mit der unter PIM verglichen. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Reduktion des Pruritus durch TCA (Tag 8: $p = 0,009$; Tag 22: $p = 0,02$).

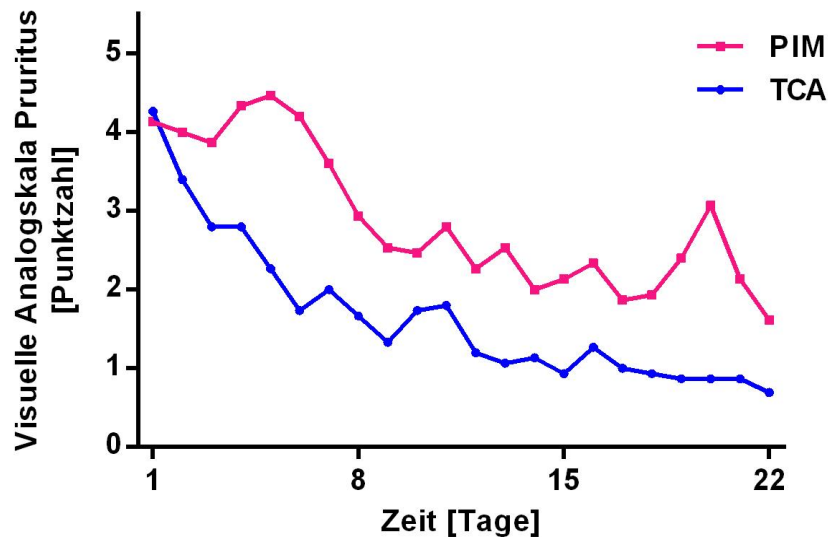


Abb. 3: Punktzahl einer visuellen Analogskala von null bis zehn zur Beurteilung des Pruritus an jedem Behandlungstag mit Hilfe eines Tagebuchs ($n = 15$ Probanden): Unter der Behandlung mit TCA war eine kontinuierliche und signifikante Reduktion des Pruritus im Vergleich zum unbehandelten Ausgangspunkt an Tag 1 zu beobachten. Im Gegensatz dazu kam es unter Behandlung mit PIM in der ersten Woche zu einem transienten, leichten Anstieg des Pruritus. Erst im weiteren Behandlungszeitraum kam es auch unter Behandlung mit PIM zu einer signifikanten Reduktion des Pruritus im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswert. Es zeigte sich an Tag 8 und an Tag 22 eine signifikant stärkere Reduktion des Pruritus durch TCA im Vergleich zu PIM.

3.1.4 Creme-Verbrauch

Es zeigte sich eine sehr große Spannweite beim interindividuellen Cremeverbrauch. Intraindividuell gab es dagegen keine relevanten Unterschiede zwischen der verwendeten Menge an PIM bzw. TCA. So lag der absolute Gesamtverbrauch an Studienmedikation minimal bei 4,5 g TCA und 5,5 g PIM (Proband Nr. 1), der maximale bei 43 g TCA und 42 g PIM (Proband Nr. 6). Statistisch ergab sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtverbrauch zwischen PIM und TCA (Abb. 4).

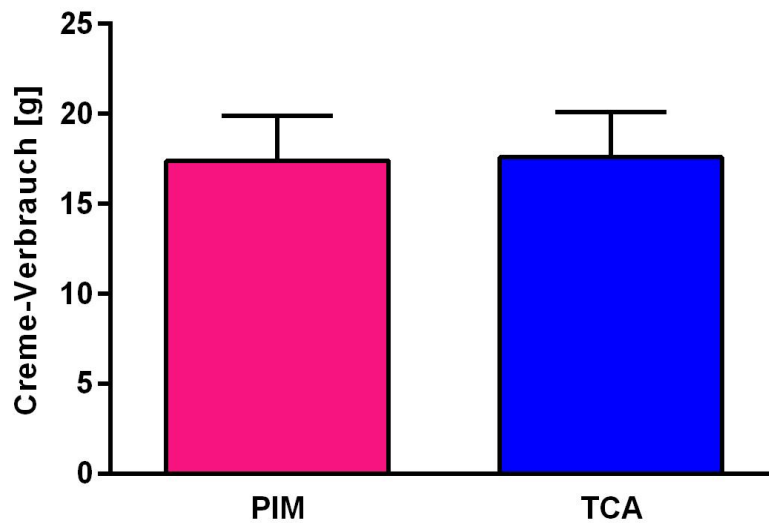


Abb. 4: Gesamtverbrauch an Studienmedikation im Zeitraum der dreiwöchigen Behandlung (n = 15 Probanden): Es zeigte sich kein Unterschied im Gesamtverbrauch zwischen den beiden Präparaten.

3.2 Biophysikalische Parameter

3.2.1 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Vor Behandlungsbeginn zeigte sich ein circa dreifach höherer transepidermaler Wasserverlust an der läsionalen Haut als an der nicht-läsionalen Haut ($p < 0,0001$) (Abb. 5).

Im Bereich der nicht-läsionalen Haut zeigte sich weder für die TCA-Behandlung noch für die PIM-Behandlung eine statistisch signifikante Veränderung des TEWL im Verlauf der Behandlung. Auch konnte kein Unterschied beim Vergleich der beiden Behandlungen miteinander festgestellt werden (Abb. 6).

Im Bereich der läsionalen Haut hingegen wurde der TEWL durch die TCA-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Haut bereits an Tag 8 und auch an Tag 22 statistisch signifikant gesenkt (Tag 8: $p = 0,04$; Tag 22: $p = 0,0001$) (Abb. 7). Dabei erreichte der TEWL am Ende der TCA-Behandlung nahezu Werte der nicht-läsionalen Haut. Für die PIM-Behandlung konnte im Vergleich zur unbehandelten Haut eine leichte Senkung des TEWL festgestellt werden, diese war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Beim Vergleich beider Behandlungen miteinander zeigte sich an Tag 8 noch kein signifikanter Unterschied. An Tag 22 konnte jedoch eine signifikant stärkere Senkung des TEWL durch TCA gezeigt werden ($p = 0,0003$).

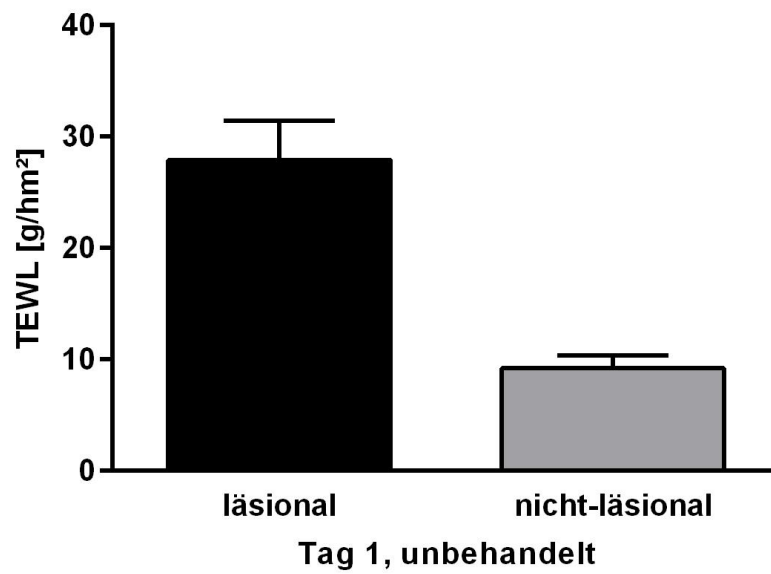


Abb. 5: Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) vor Behandlungsbeginn an Tag 1 an läsionaler und nicht-läsionaler Haut (n = 15 Probanden): Es zeigte sich ein fast dreimal höherer TEWL an der läsionalen Haut im Vergleich zur nicht-läsionalen Haut.

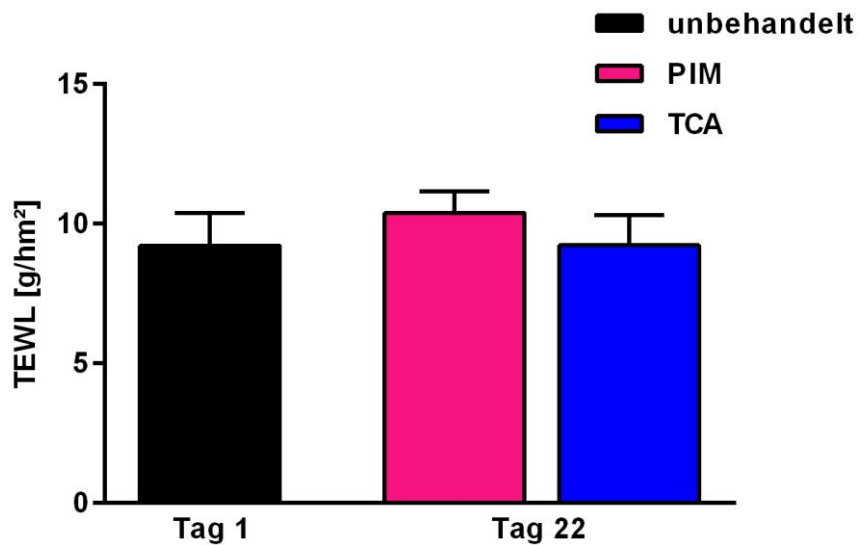


Abb. 6: Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) im Bereich der nicht-läsionalen Haut vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des TEWL durch die beiden Behandlungen.

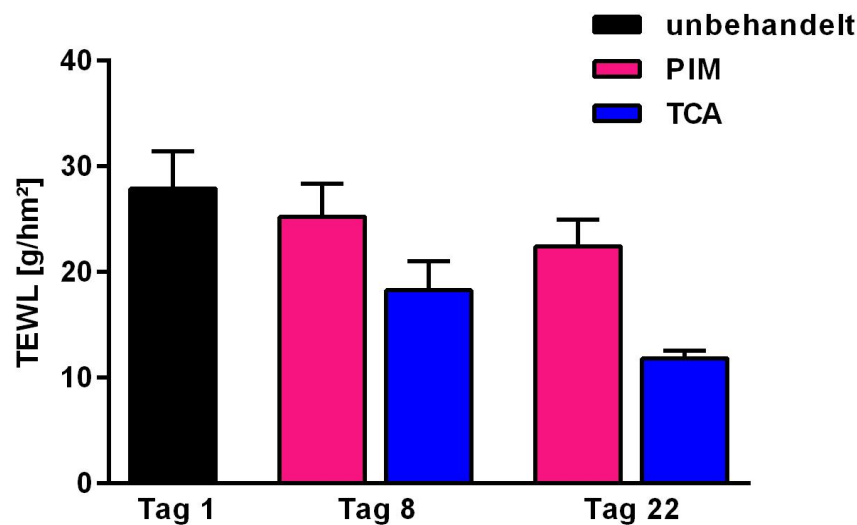


Abb. 7: Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) im Bereich der läsionalen Haut vor Behandlung an Tag 1 und nach ein- bzw. dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Es zeigte sich eine rasche und signifikante Reduktion des TEWL durch die TCA-Behandlung im Vergleich zum unbehandelten Zustand. Nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA erreichte der TEWL an der läsionalen Haut annähernd das Niveau der nicht-läsionalen Haut. Dahingegen war die Reduktion des TEWL durch die PIM-Behandlung statistisch nicht signifikant.

3.2.2 Hauthydratation

Vor Behandlungsbeginn zeigte sich eine signifikant höhere Hauthydratation an der nicht-läsionalen Haut im Vergleich zur läsionalen Haut ($p = 0,001$) (Abb. 8).

Im Bereich der nicht-läsionalen wie auch im Bereich der läsionalen Haut zeigten sich kaum Effekte durch die beiden verschiedenen Behandlungen (Abb. 9 und 10).

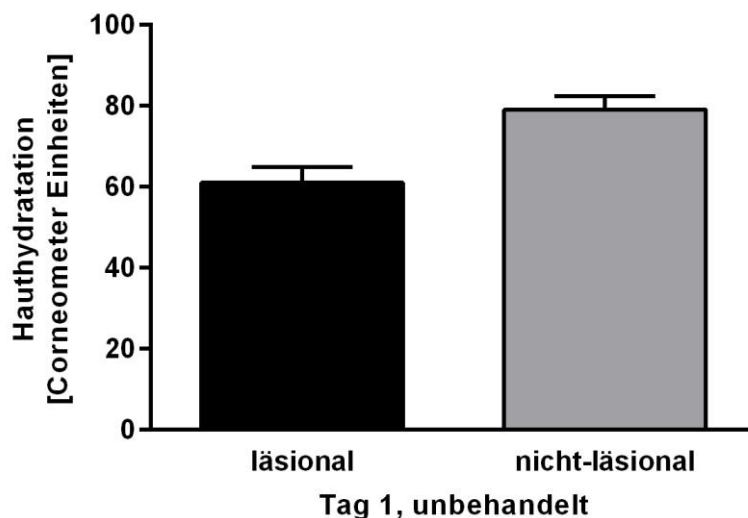


Abb. 8: Hauthydratation vor Behandlungsbeginn an Tag 1 an läsionaler und nicht-läsionaler Haut (n = 15 Probanden): Es zeigte sich eine signifikant höhere Hauthydratation an der nicht-läsionalen Haut.

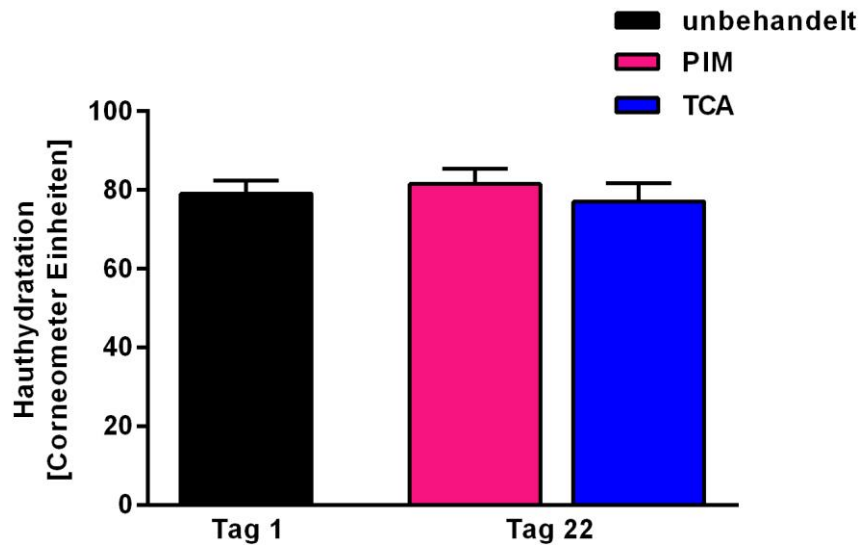


Abb. 9: Hauthydratation im Bereich der nicht-läsionalen Haut vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Die Hauthydratation wurde durch die beiden Therapien kaum verändert.

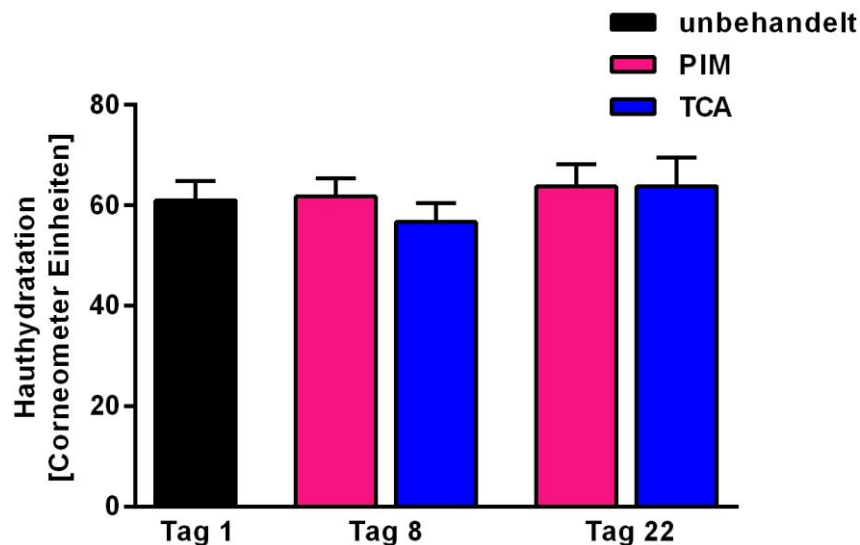


Abb. 10: Hauthydratation im Bereich der läsionalen Haut vor Behandlung an Tag 1 und nach ein- bzw. dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Auch an der läsionalen Haut zeigten sich kaum Effekte durch die beiden Therapien.

3.2.3 Integrität des Stratum corneum

Die Integrität des Stratum corneum wurde nur an nicht-läsionaler Haut gemessen. Die Messung der Integrität erfolgte indirekt durch sogenanntes „tape-stripping“ (Anzahl der benötigten tesafilm® Abrisse (tesa AG, Hamburg) bis TEWL > 30 g/hm²). Hier zeigte sich

nach dreiwöchiger Behandlung in beiden Therapiegruppen eine leichte Verschlechterung der Integrität des Stratum corneum, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 11).

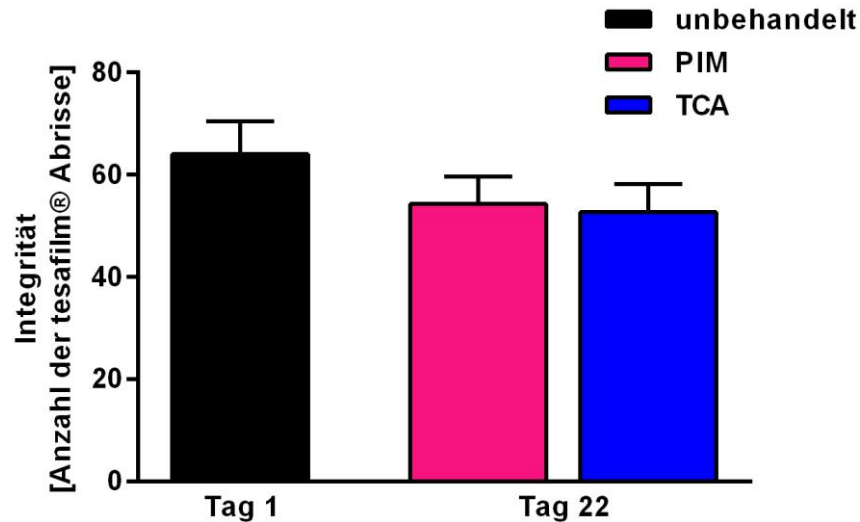


Abb. 11: Indirekte Bestimmung der Integrität des Stratum corneum vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Es zeigte sich durch beide Behandlungen eine leichte, aber nicht signifikante Verschlechterung der Integrität des Stratum corneum (Reduktion der benötigten Anzahl an tesafilm® Abrissen bis zur kompletten Barrierestörung der Haut mit einem TEWL > 30 g/hm²).

3.3 Parameter der epidermalen Proliferation

3.3.1 Dicke der Epidermis

Die Auswertung der Messergebnisse zeigte eine Reduktion der Epidermisdicke der unbehandelten, läsionalen Haut sowohl durch die dreiwöchige Behandlung mit TCA als auch durch die PIM-Behandlung (Abb. 12). Die Dicke der Epidermis wurde durch die TCA-Behandlung mehr als halbiert, was einer hoch signifikanten Reduktion entsprach ($p < 0,0001$). Die Reduktion infolge der PIM-Behandlung war geringer und statistisch nicht signifikant ($p = 0,28$). Der Vergleich der beiden Behandlungen miteinander zeigte eine statistisch signifikant höhere Reduktion der Epidermisdicke durch TCA im Vergleich zu PIM ($p = 0,0005$).

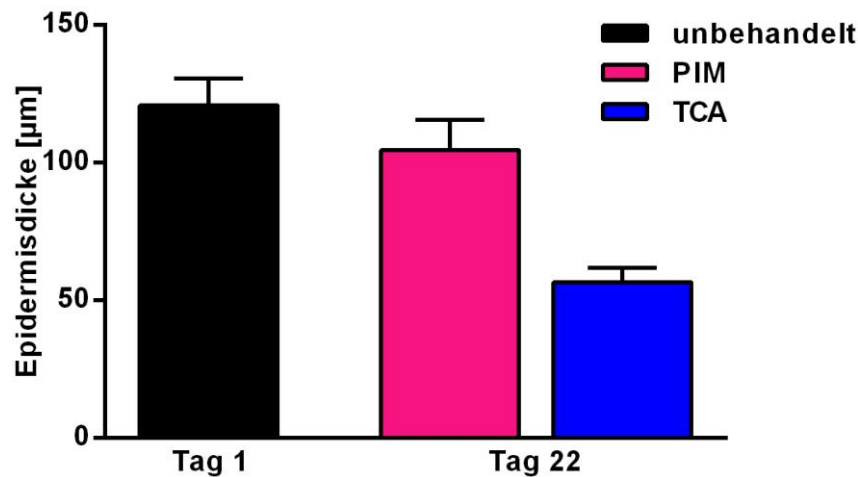


Abb. 12: Dicke der Epidermis vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Die Epidermisdicke wurde durch die TCA-Behandlung im Vergleich zum unbehandelten Zeitpunkt mehr als halbiert. Auch unter der PIM-Behandlung verringerte sich die Epidermisdicke leicht, dies erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

3.3.2 Immunhistochemische Färbung auf Ki-67

Zur Beurteilung der Proliferation wurden immunhistochemische Färbungen auf Ki-67 angefertigt. Hierbei wurden quantitativ die angefärbten Zellkerne pro Gesichtsfeld ausgezählt. Sowohl nach der Behandlung mit TCA als auch nach der mit PIM ließ sich in den histologischen Präparaten bei Vergleich des unbehandelten Zustandes mit dem Zeitpunkt nach Behandlung eine verringerte Proliferationsaktivität darstellen (Abb. 13 und 14). Dieser Effekt war unter TCA-Behandlung deutlicher ausgeprägt und statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Dahingegen erreichte der Effekt unter Behandlung mit PIM keine statistische Signifikanz ($p = 0,08$). Betrachtete man die beiden Therapiegruppen nach Abschluss der Behandlung miteinander, so zeigte TCA im Vergleich zu PIM eine signifikant höhere Reduktion der Proliferationsaktivität ($p = 0,002$).

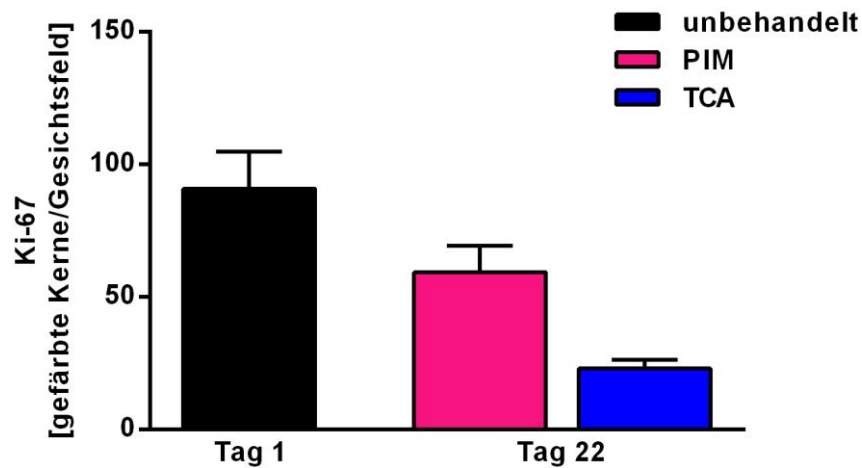


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung auf Ki-67 vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Der Proliferationsmarker Ki-67 ließ sich nach Therapie mit beiden Präparaten im Vergleich zum unbehandelten Zeitpunkt quantitativ weniger anfärben. Die Reduktion der Proliferationsaktivität war bei dem jeweiligen Vergleich vor zu nach Behandlung nur für TCA statistisch signifikant. Auch bei Vergleich der beiden Therapiegruppen miteinander wurde die Proliferationsaktivität durch TCA signifikant stärker gesenkt als durch PIM.

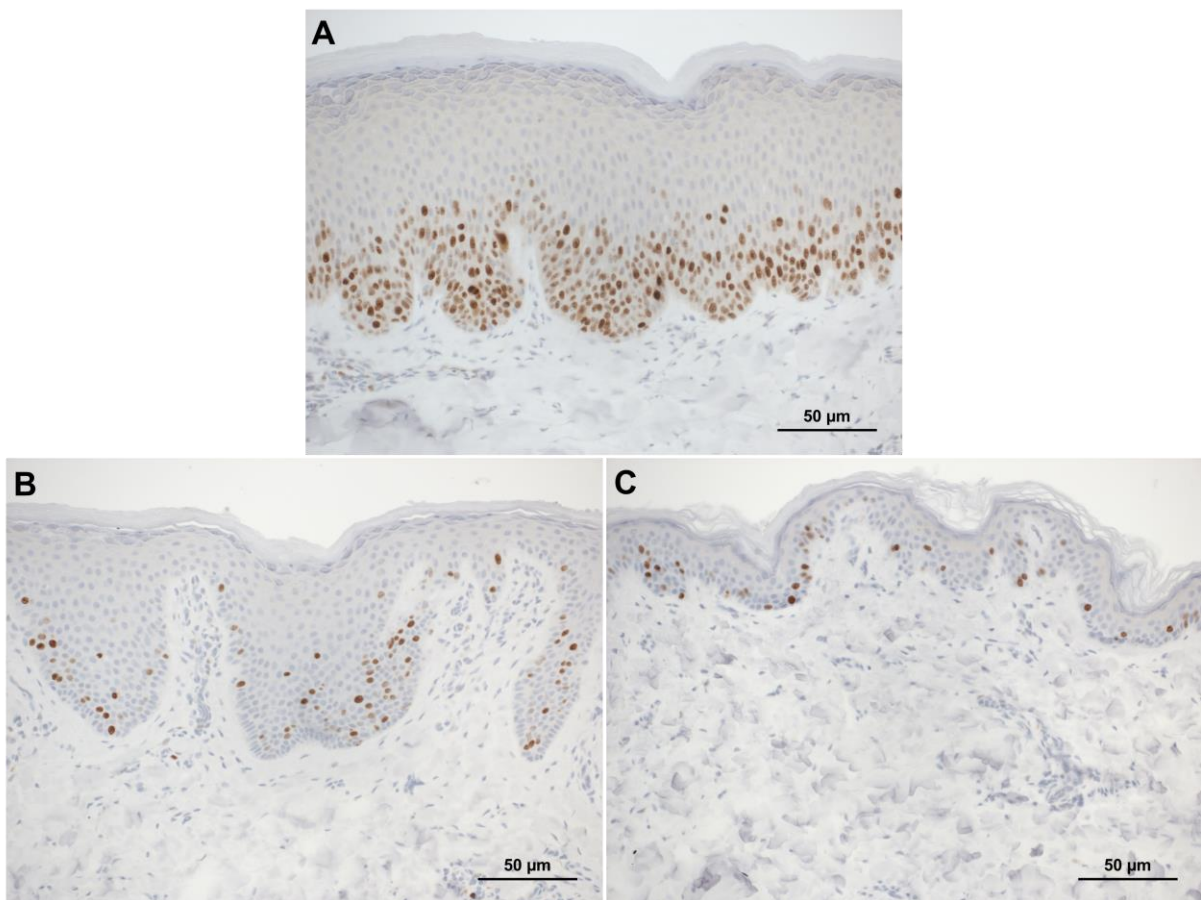


Abb. 14: Immunhistochemische Färbungen auf den Proliferationsmarker Ki-67 (Aufnahmen von Proband Nr. 11): (A) vor Behandlung an Tag 1, (B) nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM, (C) nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA.

3.3.3 Immunhistochemische Färbung auf Cytokeratin 16

Die Auswertung der histologischen Präparate, die immunhistochemisch auf das proliferations-assoziierte Cytokeratin 16 gefärbt wurden, erbrachte analoge Ergebnisse zu den Färbungen auf Ki-67. Auch hier zeigte sich bei Vergleich des unbehandelten Zustandes mit dem Zeitpunkt nach drei Wochen Behandlung eine verringerte Anfärbbarkeit von Cytokeratin 16 sowohl durch TCA als auch durch PIM (Abb. 15 und 16). Dieser Effekt war für beide Therapiegruppen statistisch signifikant (TCA: $p < 0,0001$; PIM: $p = 0,02$). Vergleich man die Behandlung mit TCA mit jener von PIM, so zeigte sich eine statistisch signifikant höhere Reduktion der Anfärbbarkeit unter TCA ($p = 0,001$).

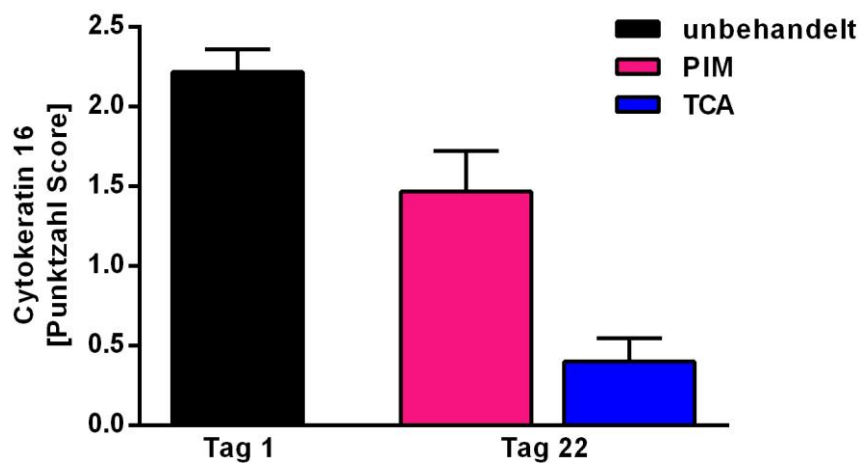


Abb. 15: Immunhistochemische Färbung auf Cytokeratin 16 vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Die Auswertung des proliferations-assoziierten Cytokeratin 16 erfolgte semi-quantitativ mit Hilfe eines Score-Systems. Es ließ sich analog zu den Ergebnissen der Ki-67-Färbung nach dreiwöchiger Therapie mit beiden Präparaten eine verringerte Anfärbbarkeit des Cytokeratin 16 nachweisen. Diese Reduktion war für beide Therapien statistisch signifikant. Zudem war die Reduktion durch TCA im Vergleich zu der durch PIM statistisch signifikant höher.

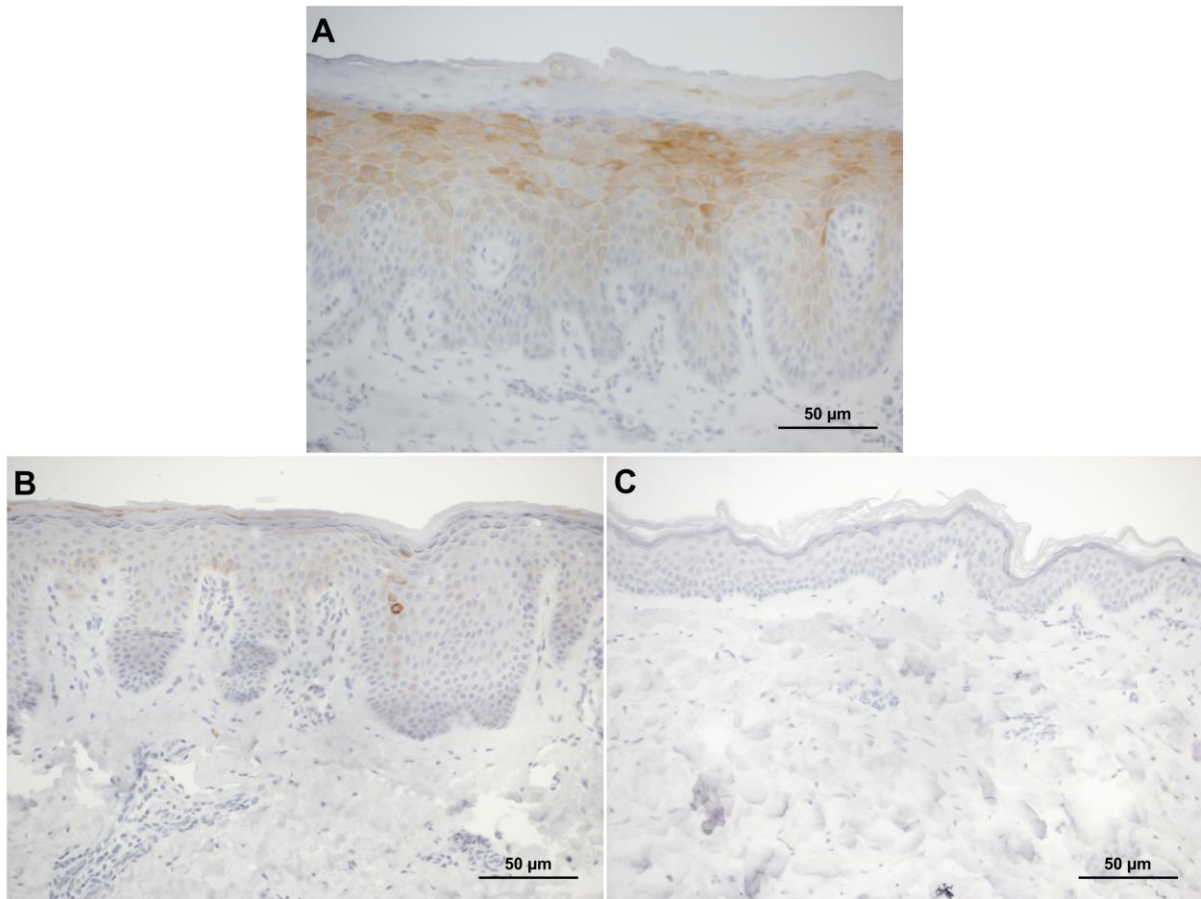


Abb. 16: Immunhistochemische Färbungen auf das proliferations-assoziierte Cytokeratin 16 (Aufnahmen von Proband Nr. 11): (A) vor Behandlung an Tag 1, (B) nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM, (C) nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA.

3.4 Parameter der epidermalen Differenzierung

3.4.1 Immunhistochemische Färbung auf Filaggrin

Bei Auswertung des semi-quantitativen Punkte-Scores für Filaggrin entsprach eine hohe Punktzahl einer hohen bzw. physiologischen Differenzierung der epidermalen Zellen. Es zeigte sich nach dreiwöchiger Behandlung in beiden Therapiegruppen eine signifikant höhere epidermale Differenzierung als vor Behandlung (TCA: $p < 0,0001$; PIM: $p = 0,02$) (Abb. 17 und 18). Bei Vergleich der beiden Therapiegruppen am Studienende ließ sich eine signifikant höhere epidermale Differenzierung nach TCA-Therapie im Vergleich zur PIM-Therapie nachweisen ($p = 0,01$).

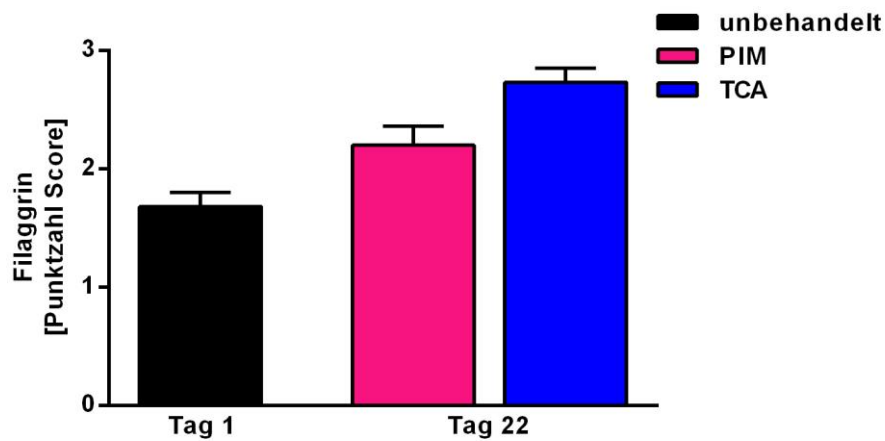


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung auf Filaggrin vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Die Auswertung des epidermalen Differenzierungsmarkers Filaggrin erfolgte mit einem semi-quantitativen Punkte-Score. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der epidermalen Differenzierung nach dreiwöchiger Therapie sowohl durch TCA als auch durch PIM im Vergleich zur unbehandelten Haut. Dabei war dieser Effekt durch TCA signifikant stärker ausgeprägt als durch PIM.

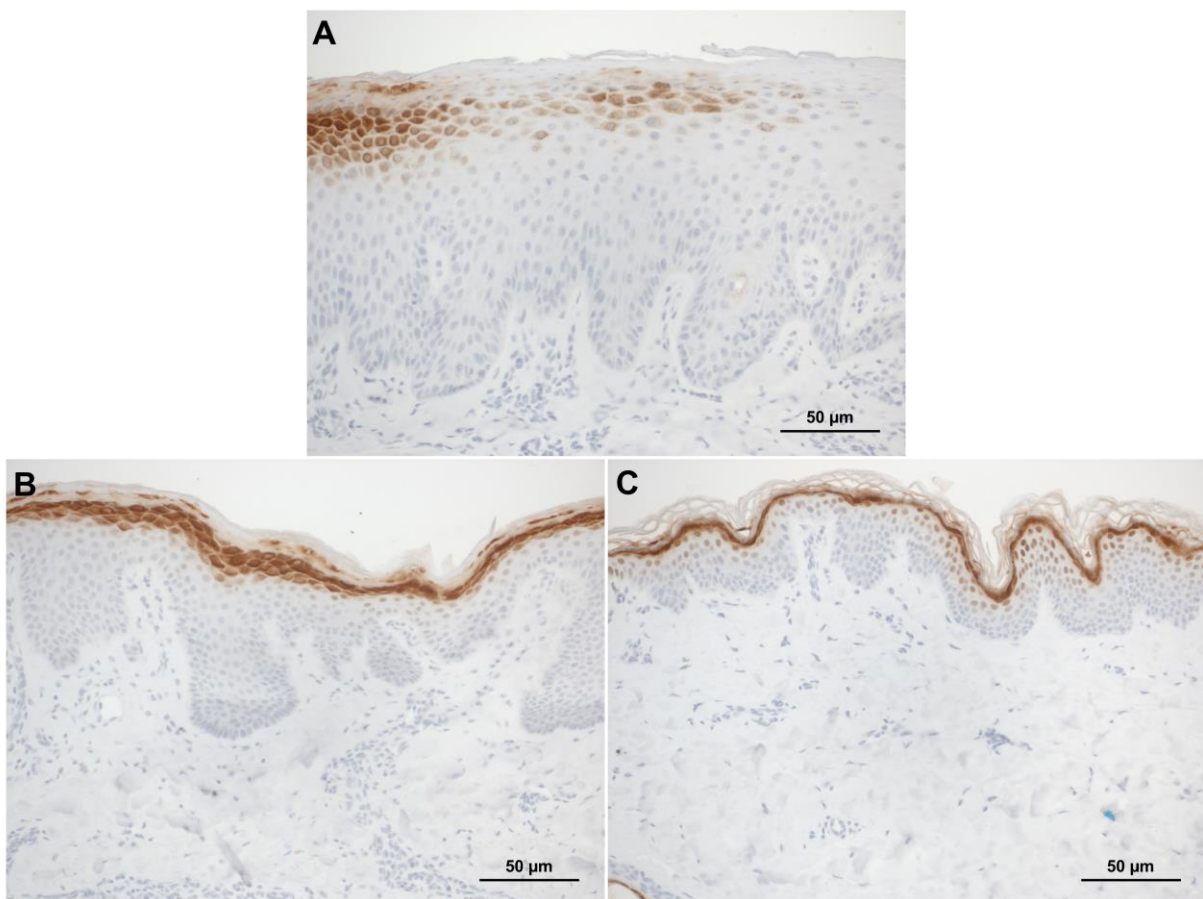


Abb. 18: Immunhistochemische Färbungen auf den epidermalen Differenzierungsmarker Filaggrin (Aufnahmen von Proband Nr. 11): (A) vor Behandlung an Tag 1, (B) nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM, (C) nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung auf Loricrin

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen auf Loricrin wurde der gleiche semi-quantitative Punkte-Score verwendet wie für Filaggrin. Dabei konnten für Loricrin vergleichbare Effekte auf die epidermale Differenzierung durch die beiden Therapien gezeigt werden (Abb. 19 und 20). So wurde der Punkte-Score durch beide Therapien signifikant erhöht bei Vergleich mit dem unbehandelten Ausgangszustand (TCA: $p < 0,0001$; PIM: $p = 0,001$). Im Falle von Loricrin konnte keine signifikante Überlegenheit von TCA im Vergleich zu PIM gezeigt werden ($p = 0,07$).

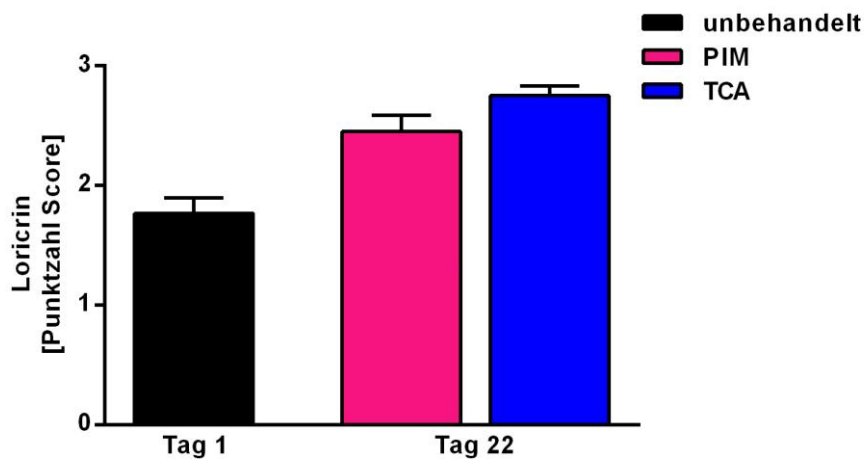


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung auf Loricrin vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Es zeigte sich analog zu den Ergebnissen der Filaggrin-Färbungen eine signifikante Erhöhung der epidermalen Differenzierung nach dreiwöchiger Therapie sowohl durch TCA als auch durch PIM im Vergleich zur unbehandelten Haut. Dabei konnte bei Vergleich der beiden Therapien miteinander kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

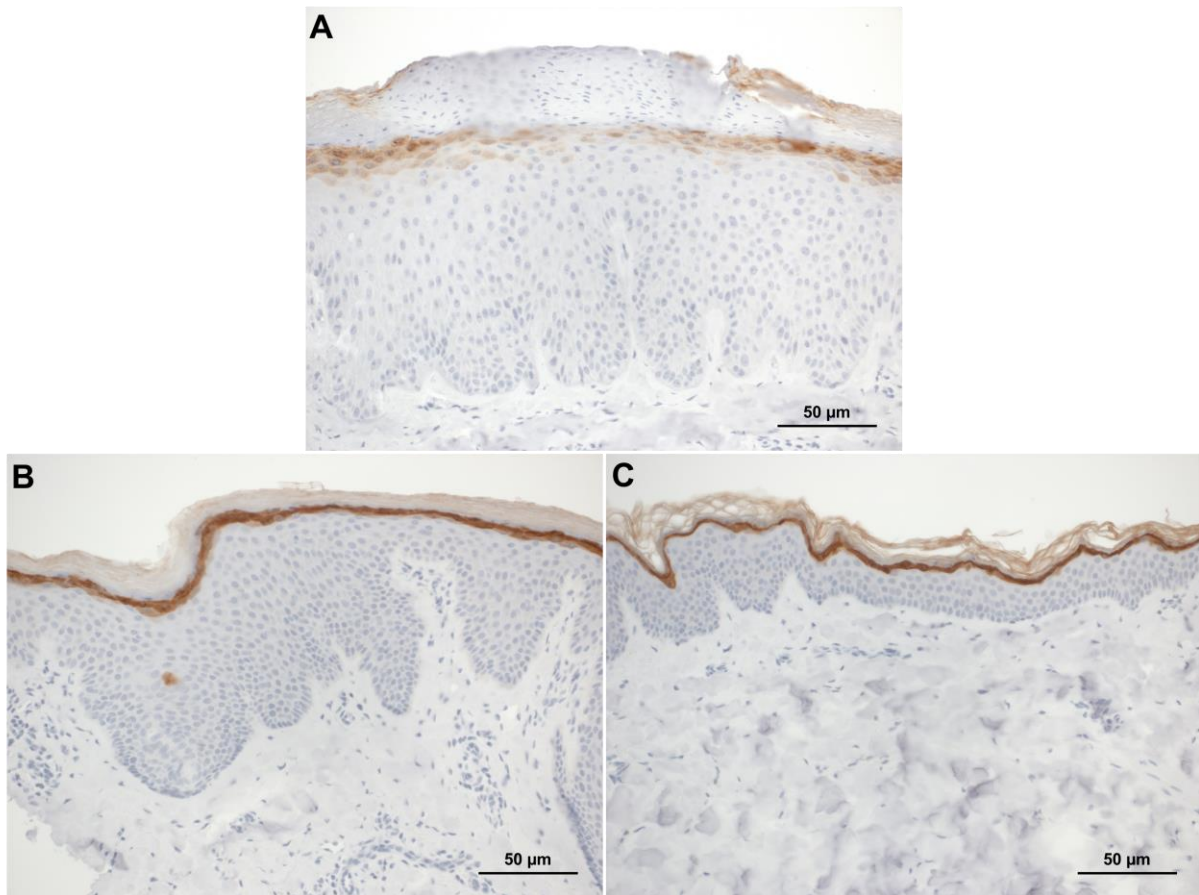


Abb. 20: Immunhistochemische Färbungen auf den epidermalen Differenzierungsmarker Loricrin (Aufnahmen von Proband Nr. 11): (A) vor Behandlung an Tag 1, (B) nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM, (C) nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA.

3.4.3 Immunhistochemische Färbung auf Involucrin

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen auf Involucrin wurde ebenfalls ein semi-quantitativer Punkte-Score verwendet. Allerdings entsprach in diesem Falle eine niedrige Punktzahl einer hohen bzw. physiologischen Differenzierung der epidermalen Zellen. Wie Abb. 21 und 22 veranschaulichen, konnten somit ähnliche Effekte gezeigt werden wie durch die oben beschriebenen Färbungen auf Filaggrin und Loricrin. Im Falle von Involucrin war die Erhöhung der epidermalen Differenzierung bei Vergleich des unbehandelten Ausgangswertes zur PIM-Behandlung jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,1$), wohl aber jene durch die TCA-Behandlung ($p < 0,0001$). Bei Vergleich der beiden Therapien miteinander konnte ein signifikant höherer Effekt auf die epidermale Differenzierung durch TCA im Vergleich zu PIM gezeigt werden ($p = 0,01$).

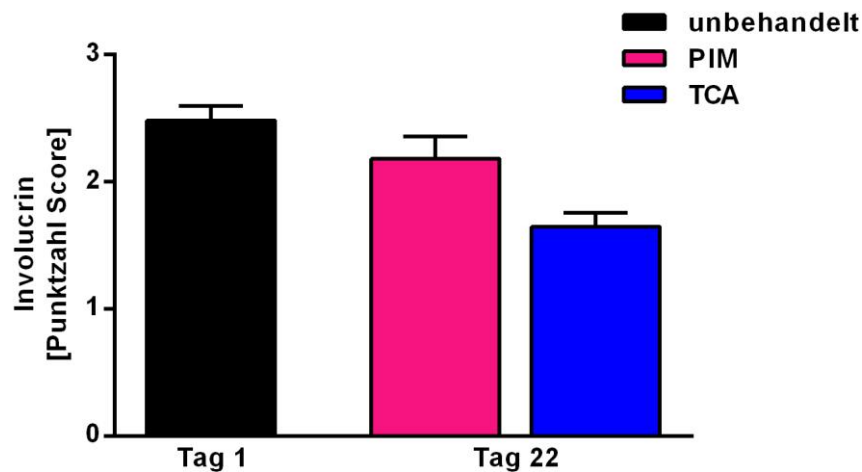


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung auf Involucrin vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA (n = 15 Probanden): Es wurde ein semi-quantitativer Score verwendet, bei dem eine niedrige Punktzahl einer hohen bzw. physiologischen epidermalen Differenzierung entsprach. Somit zeigte sich durch beide Therapien im Vergleich zum unbehandelten Zustand eine Erhöhung der epidermalen Differenzierung. Diese Erhöhung war nur für die TCA-Behandlung statistisch signifikant. Bei Vergleich der beiden Therapiegruppen miteinander konnte eine signifikant größere Erhöhung der epidermalen Differenzierung durch TCA im Vergleich zu PIM gezeigt werden.

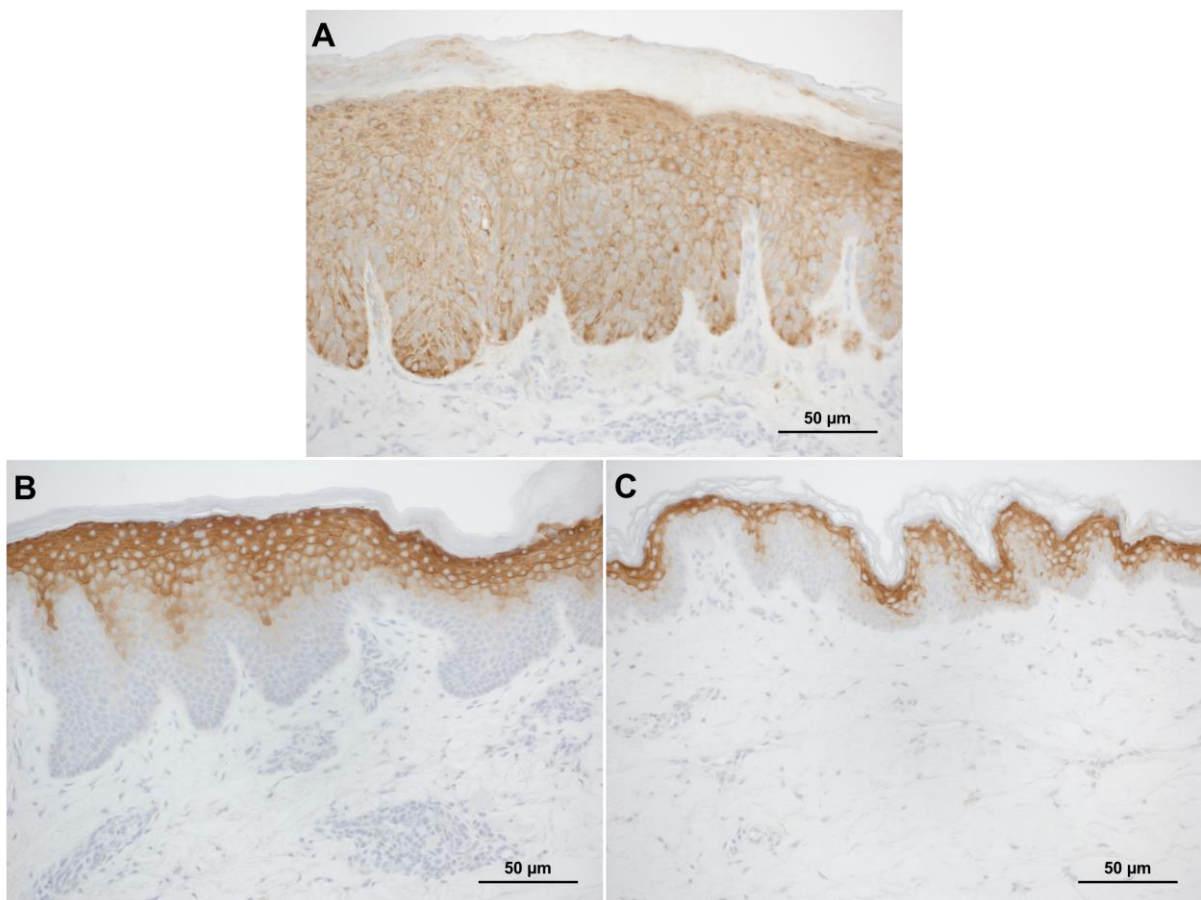


Abb. 22: Immunhistochemische Färbungen auf den epidermalen Differenzierungsmarker Involucrin (Aufnahmen von Proband Nr. 11): (A) vor Behandlung an Tag 1, (B) nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM, (C) nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA.

3.5 Lamellenkörperchen

Im Rahmen der transmissions-elektronenmikroskopischen Auswertung wurde zunächst die absolute Anzahl an Lamellenkörperchen (LK) bestimmt. Diese wurde durch die beiden Therapien nicht verändert (MW Tag 1: 75 LK, MW Tag 22 TCA: 76 LK, MW Tag 22 PIM: 78 LK). Im Weiteren wurden Lamellenkörperchen, die mehr als 50 % lamellare Struktur enthielten, als physiologisch gewertet. Vor Behandlung wurden nur etwa 31 % der Lamellenkörperchen als physiologisch gewertet. Es zeigte sich durch beide Therapien im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswert eine Erhöhung des Prozentsatzes an physiologischen Lamellenkörperchen, im Falle von PIM kam es fast zu einer Verdopplung auf circa 59 % physiologische Lamellenkörperchen, was einem prozentualen Zugewinn von etwa 86 % entsprach ($p < 0,0001$) (Abb. 23). Die Erhöhung der Anzahl physiologischer Lamellenkörperchen war nach TCA-Therapie geringer. Insgesamt wurden circa 46 % physiologische Lamellenkörperchen beobachtet, was einem prozentualen Zugewinn von ebenfalls circa 46 % entsprach ($p = 0,003$). Damit ergab sich eine statistisch signifikant stärkere Erhöhung des Anteils an physiologischen Lamellenkörperchen durch PIM im Vergleich zu TCA ($p = 0,046$) (Abb. 24 und 25).

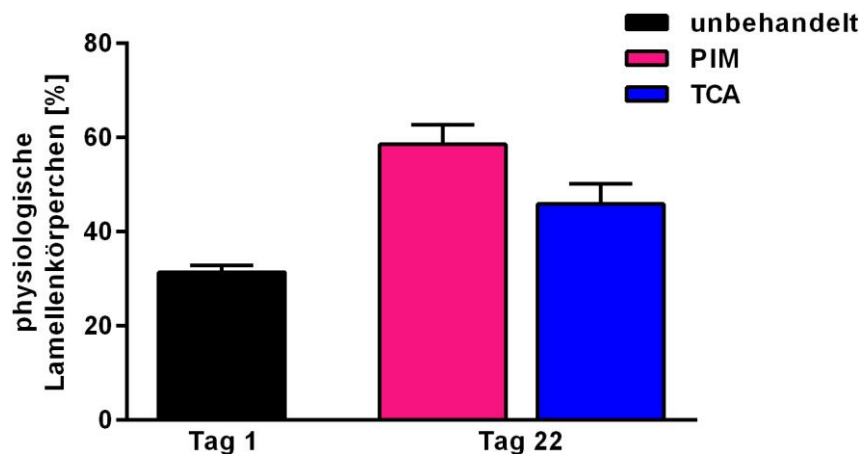


Abb. 23: Prozentsatz physiologischer Lamellenkörperchen vor Behandlung an Tag 1 und nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM bzw. TCA ($n = 13$ Probanden): Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Prozentsatzes an physiologischen Lamellenkörperchen in beiden Therapiegruppen im Vergleich zum unbehandelten Ausgangszustand. Dieser Effekt war unter PIM-Therapie signifikant stärker ausgeprägt als unter TCA-Therapie.

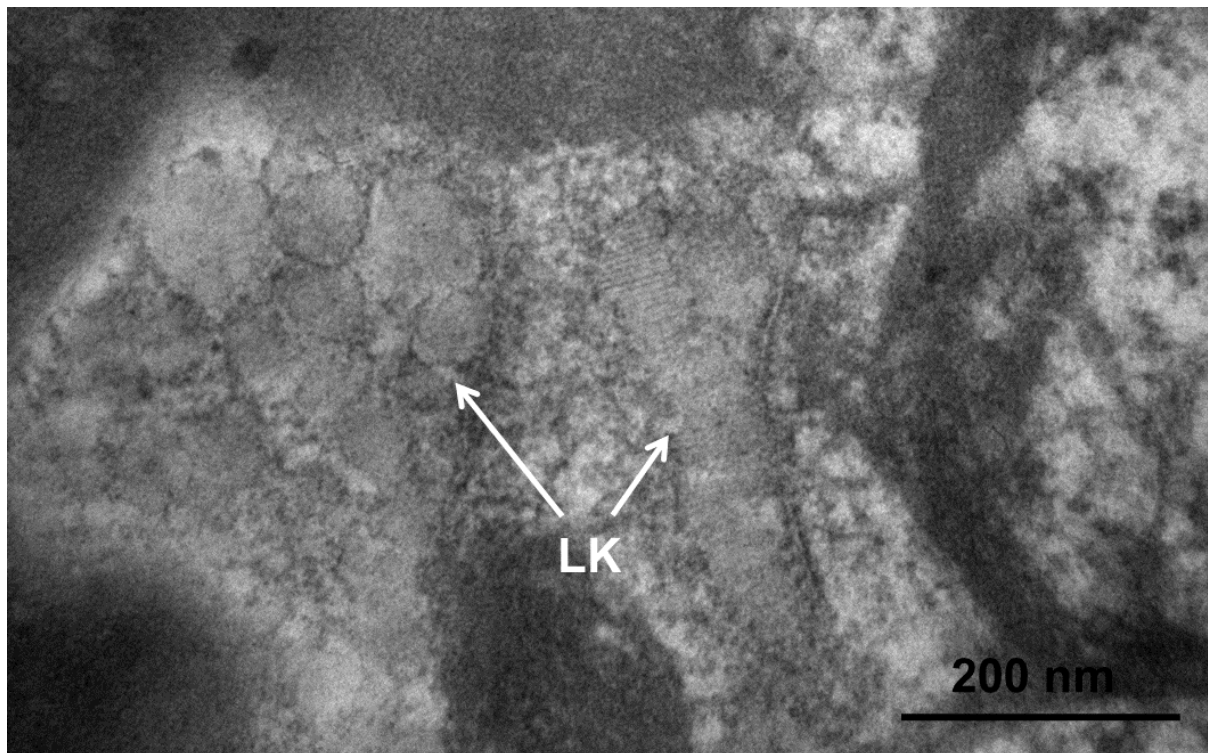


Abb. 24: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme von unbehandelter, läsionaler Haut (Aufnahme von Proband Nr. 7): Es zeigten sich überwiegend Lamellenkörperchen (LK), die weniger als 50 % lamellare Struktur enthielten (Pfeile). Diese wurden in der statistischen Auswertung als nicht physiologisch gewertet.

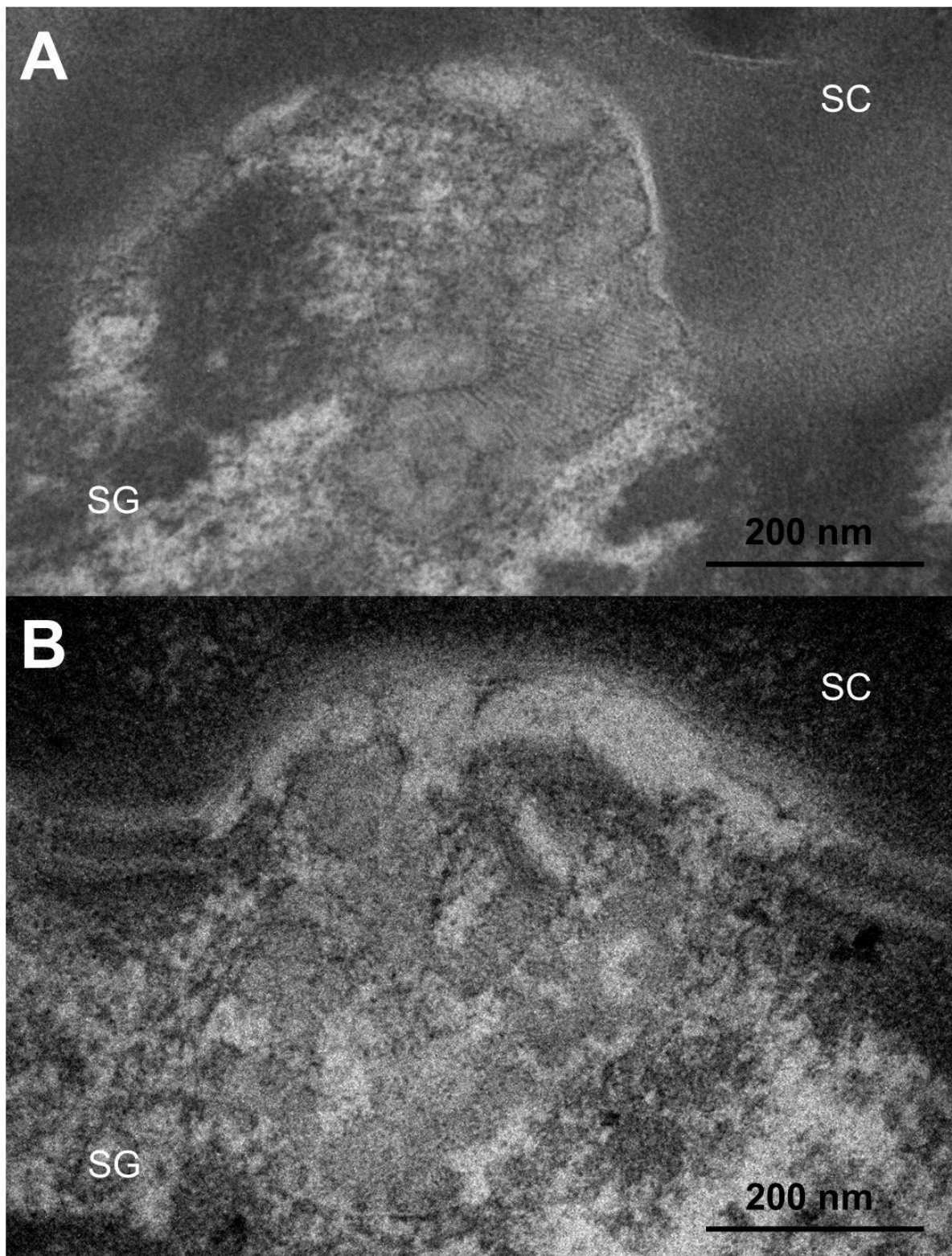


Abb. 25: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen von läsionaler Haut (A) nach dreiwöchiger Behandlung mit PIM, (B) nach dreiwöchiger Behandlung mit TCA (Aufnahmen von Proband Nr. 7): Nach Behandlung mit PIM zeigten die Lamellenkörperchen am Stratum granulosum/Stratum corneum Übergang (SG, SC) häufiger einen physiologischen Aufbau als nach Behandlung mit TCA.

4 Diskussion

4.1 Klinische Parameter

Die Ergebnisse für die dreiwöchige Behandlung mit 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme (TCA) entsprachen der klinischen Erfahrung insofern, als dass es zu einer raschen Verbesserung der klinischen Parameter kam. Bereits nach einwöchiger Behandlung wurde die Läsionsgröße halbiert und der pEASI statistisch signifikant verringert. Läsionsgröße und pEASI wurden bis zum Studienende weiter kontinuierlich gesenkt. Erstaunlicherweise konnte für die dreiwöchige Behandlung mit 1 % Pimecrolimus Creme (PIM) weder an Tag 8 noch an Tag 22 eine statistisch signifikante Verbesserung dieser klinischen Parameter gezeigt werden, obwohl eine deutliche Tendenz in diese Richtung zu erkennen war. Die klinische Wirksamkeit topisch applizierter Calcineurin-Inhibitoren wurde in vielen Studien gezeigt (Review: Gutfreund et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte am ehesten aufgrund der kleinen Anzahl untersuchter Patienten ($n = 15$) und der relativ großen Standardabweichung keine statistische Signifikanz gezeigt werden. Ein Unterschied in den beiden Behandlungsgruppen vor Therapiebeginn konnte als Ursache für das bessere Abschneiden von TCA im Vergleich zu PIM ausgeschlossen werden, da die Einschlusskriterien der Studie entsprechend gewählt waren. Dies bestätigte auch die statistische Auswertung der beiden Gruppen im Vergleich miteinander. Die stärkere Senkung des pEASI durch TCA im Vergleich zu PIM könnte zumindest teilweise auch durch einen weiteren Effekt erklärt werden. Berechnungsgrundlage des pEASI waren die Einzelpunkte Erythem, Infiltration, Exkoration und Lichenifikation. Dabei reduzierten topisch angewendete Steroide ein Erythem zumindest auch anteilig durch ihren – als Nebenwirkung gut bekannten – vasokonstriktiven Effekt (Witt 2010). Beispielsweise erfolgte die Einteilung topisch angewendeter Steroide in verschiedene Potenzklassen nach dem Maß ihrer vasokonstriktiven Fähigkeit (Kirkland et al. 2006). Topisch angewendete Calcineurin-Inhibitoren besaßen dagegen keinen vasokonstriktiven Effekt.

Während der dreiwöchigen Behandlung bewerteten die Probanden täglich ihren Pruritus mithilfe einer visuellen Analogskala. Auch hier zeigte sich beim Vergleich der beiden Behandlungen miteinander an den meisten Tagen ein statistisch signifikant besseres Abschneiden von TCA. Auffällig war in der mit PIM behandelten Gruppe, dass es an Tag vier, fünf und sechs zu einem Anstieg des Pruritus über den unbehandelten Ausgangswert hinaus kam, bevor der Pruritus gesenkt wurde. Möglicherweise könnten die Patienten einen

gesteigerten Pruritus in dieser Zeitspanne durch lokale Irritationen empfunden haben. Bei der häufigsten beschriebenen Nebenwirkung von PIM handelte es sich nämlich um lokales Brennen nach dem Auftragen der Creme, was sich mit zunehmender Dauer der Behandlung meist abschwächte (Luger et al. 2013). Insgesamt war die Senkung des Pruritus nicht nur statistisch signifikant stärker durch TCA als durch PIM, sondern auch kontinuierlicher (Abb. 3). Es stellte sich allerdings die Frage, ob die Senkung des Pruritus tatsächlich mit einer Verbesserung der atopischen Dermatitis gleichzusetzen war oder ob es sich dabei um einen davon unabhängigen Effekt handelte. In der aktuellen Literatur wurde ein direkter anti-pruritogener Effekt von topisch applizierten Steroiden vielfach untersucht und bisher kontrovers diskutiert. So induzierten beispielsweise Sekine et al. mit einer Reihe verschiedener Substanzen Pruritus in einem Maus-Modell. Sie untersuchten im Folgenden das Kratz-Verhalten der Mäuse ohne weitere Therapie und unter topischer Applikation von anti-pruritogenen Substanzen wie beispielsweise Capsaicin oder dem Steroid Clobetasol. Clobetasol zeigte dabei eine Reduktion des Kratz-Verhaltens und damit eindeutig einen anti-pruritogenen Effekt (Sekine et al. 2012). Auch Capsaicin zeigte einen ähnlichen Effekt. Allerdings zeigte erstaunlicherweise nur Clobetasol eine Reduktion des Kratz-Verhaltens bei allen getesteten Pruritus-Induktoren, wohingegen Capsaicin nur bei einzelnen Auslösern einen Effekt zeigte. Das topische Steroid war damit das potenteste anti-pruritogene Therapeutikum unter den getesteten Substanzen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten andere Arbeitsgruppen eine Steigerung des Pruritus durch topisch applizierte Steroide (Yamaura et al. 2012). Yamaura et al. induzierten in einem Maus-Modell ein chronisches Kontaktekzem durch rezidivierende Anwendung von 2,4,6-Trinitro-1-chlorobenzol (TNCB). Das auftretende Ekzem wurde in einer Gruppe topisch mit Dexamethason behandelt und mit einer unbehandelten zweiten Gruppe in Bezug auf das Kratz-Verhalten der Mäuse verglichen. Hierbei zeigte sich eine Steigerung des Kratz-Verhaltens durch Dexamethason (Yamaura et al. 2012). Allerdings erschien die Übertragbarkeit dieser Aussage aus dem Maus-Modell mit unspezifischem chronischem Kontaktekzem auf menschliche atopische Dermatitis sehr gering.

Um auszuschließen, dass unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Behandlungsgruppen durch einen unterschiedlichen Creme-Verbrauch entstanden, wurden die Patienten angeleitet die applizierte Menge der Studienmedikation nach der sogenannten „Finger-Tip Unit“ zu bemessen (Long und Finlay 1991). Pro Behandlungsarm und –anwendung waren maximal vier „Finger-Tip Units“ gestattet. Trotz dieser Unterweisung zeigte sich eine sehr große

Spannweite beim interindividuellen Cremeverbrauch. Betrachtete man den minimalen und den maximalen Creme-Verbrauch, so verbrauchte Proband Nr. 6 circa achtmal mehr Studienmedikation als Proband Nr. 1. Erfreulicherweise wurden intraindividuell allerdings keine Differenzen zwischen der verwendeten Menge an TCA und PIM beobachtet. Somit konnten die beiden unterschiedlichen Therapien zwar im Einzelfall intraindividuell gut miteinander verglichen werden, für die statistische Auswertung der gemittelten Gesamtgruppen lagen allerdings keine optimalen Voraussetzungen vor.

Zusammenfassend sahen wir in unserer Studie für die gängigen klinischen Symptome, wie Größe und Ausprägungsgrad des Ekzems sowie den Pruritus, ein deutlich besseres Abschneiden des topischen Steroids TCA. Verfälschungen dieses Ergebnisses durch einen unterschiedlichen Creme-Verbrauch konnten weitestgehend ausgeschlossen werden. Es sollte allerdings bedacht werden, dass die hier untersuchten klinischen Parameter lediglich einen Teil der Erkrankungsaktivität erfassen und nicht das gesamte Spektrum der Pathophysiologie der atopischen Dermatitis widerspiegeln. Außerdem könnten bekannte Nebeneffekte einer topischen Steroidtherapie wie die lokale Vasokonstriktion oder auch ein mutmaßlich direkter anti-pruritogener Effekt die Ergebnisse zugunsten von TCA beeinflusst haben.

4.2 Biophysikalische Parameter

Vor Behandlungsbeginn beobachteten wir einen fast dreifach höheren transepidermalen Wasserverlust (TEWL) an läsionaler Haut als an nicht-läsionaler Haut. Dies suggerierte, dass sich der TEWL als guter Parameter für eine Beurteilung der epidermalen Barriere eignete. In der Literatur wurde der TEWL bei Hautgesunden mit knapp 10 g/hm² angegeben (Jensen et al. 2004). Zumeist wurde darüber berichtet, dass bei atopischer Dermatitis bereits an nicht-läsionaler Haut ein erhöhter TEWL und damit eine gestörte epidermale Barriere vorläge (Proksch et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht bestätigt werden. Bei der kleinen Anzahl an Probanden von $n = 15$ lag der TEWL an nicht-läsionaler Haut etwa auf dem Niveau von Hautgesunden. Dies könnte auch erklären, warum an nicht-läsionaler Haut kaum Effekte durch die beiden Therapien beobachtet wurden und der TEWL nach Behandlung fast unverändert zum Ausgangswert war. An läsionaler Haut dagegen konnte eine deutliche Senkung des TEWL durch die beiden Therapien beobachtet werden. Durch Behandlung mit TCA sank der TEWL am Ende der dreiwöchigen Behandlung fast auf das Niveau der nicht-läsionalen Haut. Beim Vergleich der beiden Therapien miteinander erschien die Behandlung mit PIM zunächst deutlich unterlegen, da die Senkung des TEWL deutlich

geringer ausfiel und nicht statistisch signifikant war. Es stellte sich allerdings die Frage, ob die Senkung des TEWL wirklich einer strukturellen Verbesserung der epidermalen Barriere entsprach. Der TEWL wurde nämlich von zwei Komponenten beeinflusst: zum einen von der epidermalen Barriere, zum anderen aber auch von einer Bewegungskomponente, welche letztlich maßgeblich von dem Blutfluss in den epidermalen Gefäßen bestimmt wurde (Endo et al. 2007). Da TCA als topisch angewendetes Steroid einen bekannten vasokonstriktiven Effekt auf die epidermalen Gefäße besaß, konnte es dadurch zumindest teilweise den TEWL senken ohne die epidermale Barriere beeinflusst zu haben (Proksch et al. 2008). Andersherum betrachtet, musste die – wenn auch geringere – Senkung des TEWL durch PIM wirklich auf einer Verbesserung der epidermalen Barriere beruhen, da für topisch angewendete Calcineurin-Inhibitoren bisher kein vasokonstriktiver Effekt bekannt war.

Bei der technischen Durchführung der Messung des TEWL wurde versucht äußere Einflussgrößen wie Schwitzen des Probanden, Raumtemperatur, Windzug, tagesabhängige Schwankungen in dem Grad der Luftfeuchtigkeit usw. weitestgehend auszuschalten. Hierfür wurden die Messungen stets in demselben Untersuchungsraum bei geschlossenem Fenster durchgeführt. Auch mussten die Probanden mindestens zehn Minuten ruhig in dem Raum gesessen haben, bevor die Messungen begannen. Darüber hinaus wurde jede Messregion (z.B. rechter Arm läsional oder linker Arm nicht-läsional) dreimal gemessen. Dennoch blieb die Messung des TEWL generell eine relativ störanfällige Methode. Dies beeinflusste sicherlich die relativ hohe Standardabweichung unserer Ergebnisse und zusammen mit der kleinen Stichprobenzahl von $n = 15$ auch das statistisch nicht signifikante Abschneiden von PIM.

Als weiterer Parameter wurde die Hauthydratation gemessen. Hier beobachteten wir eine signifikant höhere Hauthydratation an nicht-läsionaler Haut im Gegensatz zu läsionaler Haut. Zog man aus der Literatur Zahlen zur Hydratation bei Hautgesunden hinzu, so zeigte sich an nicht-läsionaler Haut bei atopischer Dermatitis noch immer eine deutlich niedrigere Hydratation als bei Hautgesunden (Jensen et al. 2004). Dies bestätigte die in der Literatur weit verbreitete Meinung, dass bei atopischer Dermatitis bereits an nicht-läsionaler Haut eine relevante Störung der epidermalen Barriere vorläge (Proksch et al. 2006). Überraschenderweise konnten für beide Therapien keine relevanten Effekte auf die Hauthydratation gezeigt werden. Dies galt für nicht-läsionale Haut wie für läsionale Haut.

Als letzter biophysikalischer Parameter wurde die Integrität des Stratum corneum durch sogenanntes „tape-stripping“ gemessen. Hierbei handelte es sich um eine technisch sehr leicht durchführbare Methode, die allerdings viele mögliche Fehlerquellen in der Durchführung

aufwies. Es wurde versucht diese durch systematisches Vorgehen möglichst gering zu halten. Dazu wurden die verwendeten tesafilm® Streifen (tesa AG, Hamburg) stets von dem gleichen Produkt verwendet und in einer identischen Länge und Breite zugeschnitten. Im Folgenden wurden die Streifen dann auf die Haut aufgeklebt und wieder abgerissen. Die Untersuchung wurde dabei stets von der gleichen Person durchgeführt, die versuchte nach subjektivem Maßstab die tesafilm® Streifen immer mit dem gleichen Druck aufzubringen und mit der gleichen Geschwindigkeit wieder abzureißen. Leider konnten diese beiden Einflussgrößen, nämlich Anklebedruck und Abreißgeschwindigkeit, nicht objektiv gemessen werden. Es war daher davon auszugehen, dass diese einer gewissen Schwankungsbreite unterlegen waren, was die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich abschwächte. Überraschenderweise wurde nach dreiwöchiger Therapie an nicht-läsionaler Haut für beide Präparate eine leichte Verschlechterung der Integrität des Stratum corneum gezeigt, auch wenn diese keine statistische Signifikanz erreichte. Unterschiede zwischen den beiden Therapien wurden dabei nicht beobachtet. Unklar blieb, ob es sich bei dieser Verschlechterung der Integrität des Stratum corneum um einen realen Effekt handelte. Nicht auszuschließen blieb, dass der Untersucher mit wachsender Durchführungsroutine das für den Probanden leicht schmerzhaftes „tape-stripping“ unbewusst weniger zögerlich durchführte und dadurch der Anklebedruck im Verlauf der Studie größer wurde und die Abreißgeschwindigkeit schneller. Dadurch könnte eine Reduktion der benötigten tesafilm® Abrisse bis zur kompletten Barrierestörung vorgetäuscht worden sein.

Eine Messung der Integrität des Stratum corneum an läsionaler Haut war mit dieser Methode nicht möglich. Es wurde nämlich die Anzahl der benötigten tesafilm® Abrisse bis zur kompletten Barrierestörung bestimmt. Eine komplette Barrierestörung wurde über einen TEWL $> 30 \text{ g/hm}^2$ definiert. An läsionaler Haut lag der TEWL allerdings schon vor dem „tape-stripping“ um die 30 g/hm^2 . Auch dies musste als deutlicher Nachteil der Methode betrachtet werden, denn eine Messung der Integrität des Stratum corneum wäre gerade an läsionaler Haut interessant gewesen.

Zusammenfassend zeigten alle drei Methoden zur Bestimmung biophysikalischer Parameter relativ viele mögliche Fehlerquellen in der Durchführung. Bei der Senkung des TEWL zeigte sich die Behandlung mit TCA deutlich effektiver. Anzuzweifeln blieb allerdings, ob dieser Effekt wirklich einer (ultra-)strukturellen Verbesserung der epidermalen Barriere entsprach. Die Hauthydratation wurde durch beide Therapien kaum beeinflusst. Die Integrität des Stratum corneum wurde wiederum durch beide Therapien gleichermaßen dezent

verschlechtert. Insgesamt konnte daher in Bezug auf die biophysikalischen Parameter kein eindeutiger Vorteil einer der beiden Therapien erkannt werden.

4.3 Parameter der epidermalen Proliferation

Eine epidermale Hyperproliferation bei atopischer Dermatitis wurde in der Literatur vielfach beschrieben, wobei die Ursachen hierfür noch nicht vollständig geklärt sind. Einige Arbeitsgruppen postulierten beispielsweise einen Zusammenhang zwischen erhöhten Histamin-Spiegeln in läsionaler Haut und der Expression des Histamin-4-Rezeptors in Keratinozyten (Glatzer et al. 2013).

Unabhängig von den möglichen Ursachen konnten wir lichtmikroskopisch mit drei verschiedenen Methoden bzw. Färbungen eine epidermale Hyperproliferation vor Behandlungsbeginn an läsionaler Haut bestätigen. Die Epidermisdicke bei Hautgesunden wurde je nach Lokalisation mit 50-100 µm angegeben (Lüllmann-Rauch 2003). In unserem Probandenkollektiv lag die Epidermisdicke in der unbehandelten, läsionalen Haut im Mittel mindestens 20 % höher, nämlich absolut bei circa 120 µm. Immunhistochemische Färbungen auf Ki-67 eigneten sich besonders gut, um die Proliferationsaktivität zu beurteilen, da mit diesem Marker Zellkerne angefärbt wurden, die sich in der Mitose befanden (Gerdes 1985). Vergleicht man die Proliferationsaktivität unseres Probandenkollektivs mit Hautgesunden, so war eine drastische Erhöhung zu erkennen. Bei Hautgesunden fanden sich laut Jensen et al. durchschnittlich nur knapp 10 gefärbte Zellkerne pro Gesichtsfeld (Jensen et al. 2004; Jensen et al. 2009), wohingegen in unserem Kollektiv durchschnittlich mehr als 90 Zellkerne pro Gesichtsfeld gefärbt wurden. Als drittes wurden immunhistochemische Färbungen auf Cytokeratin 16 untersucht. Dieses Cytokeratin wurde in der Epidermis Hautgesunder nicht exprimiert (Proksch et al. 2006). Dahingegen konnte Cytokeratin 16 in der läsionalen Haut unseres Probandenkollektivs mit atopischer Dermatitis – nur unter Aussparung des Stratum basale – nahezu in allen epidermalen Zelllagen angefärbt werden.

Alle drei Parameter der epidermalen Proliferation wurden durch die Behandlung mit TCA halbiert oder noch stärker gesenkt. Die Epidermisdicke lag am Ende der Behandlung im Mittel nur noch bei circa 57 µm. Damit konnte bereits nach nur dreiwöchiger Behandlung mit einem mittel-potenten Steroid eine beginnende und als Nebenwirkung gut bekannte Hautatrophie gezeigt werden. Auch durch die Behandlung mit PIM wurde die epidermale Hyperproliferation gesenkt, wenn auch nicht ganz so stark. Es zeigte sich nur für die immunhistochemische Färbung auf Cytokeratin 16 eine statistische Signifikanz, wobei

Cytokeratin 16 eventuell auch als der aussagekräftigste Parameter angesehen werden konnte, da es in gesunder Haut nicht exprimiert wurde (Proksch et al. 2006).

Insgesamt waren die Methoden zur Bestimmung der epidermalen Proliferation deutlich weniger störanfällig als beispielsweise die zuvor beschriebenen biophysikalischen Parameter. Die Epidermisdicke wurde pro Präparat jeweils dreimal gemessen, genauso wurden die Ki-67 gefärbten Zellkerne pro Präparat in drei verschiedenen Gesichtsfeldern gezählt. Zusätzlich wurden alle Präparate durch zwei unabhängige Untersucher ausgewertet. Für die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen auf Cytokeratin 16 wurde ein semi-quantitativer Punkte-Score entwickelt, der exakte Kriterien zur Beurteilung enthielt (Tab. 2). Hierbei wurde stets der Gesamteindruck des Präparates bewertet, die Auswertung erfolgte auch hier durch zwei unabhängige Untersucher. Während des gesamten Zeitraumes der Datenerhebung und -auswertung waren die Untersucher verblindet, so dass insgesamt subjektive Einflussgrößen weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

Zusammenfassend zeigte sich an der unbehandelten, läsionalen Haut eine deutliche Hyperproliferation. Diese konnte durch beide Therapien gesenkt werden, wobei der Effekt durch TCA deutlich stärker ausgeprägt war. Es zeigte sich allerdings durch TCA eine so starke Senkung der epidermalen Proliferation, dass bereits eine beginnende Hautatrophie zu erkennen war. Dahingegen senkte PIM die epidermale Hyperproliferation nur leicht, eine komplette Normalisierung konnte nicht erreicht werden. Es fiel daher schwer, einer der beiden Therapien einen eindeutigen Vorteil zuzusprechen.

4.4 Parameter der epidermalen Differenzierung

Um die epidermale Differenzierung zu beurteilen, führten wir immunhistochemische Färbungen auf ausgewählte Schlüsselproteine durch. Wir wählten hierfür Filaggrin, Loricrin und Involucrin aus folgenden Gründen: Filaggrin vernetzt die intrazellulären Zytokeratinfilamente zu unlöslichem Keratin und ist damit maßgeblich an dem Verhornungsprozess beteiligt. Außerdem werden einige Filaggrin-Moleküle weiter gespalten. Diese Spaltprodukte haben weitere wichtige Funktionen beim Aufbau der epidermalen Barriere (Elias und Choi 2005; Kubo et al. 2013). Für verschiedene Mutationen in dem Filaggrin-Gen wurde gezeigt, dass sie für die Entwicklung einer atopischen Dermatitis prädisponieren (Palmer et al. 2006). Loricrin und Involucrin gehören zu den sogenannten „cornified envelope“ Proteinen, die zusammen mit dem „cornified lipid envelope“ die Plasmamembran der Keratinozyten ersetzen und so unerlässlich für den strukturellen

Zusammenhalt zwischen dem hydrophilen Keratin und der hydrophoben Extrazellulärmatrix sind (Proksch et al. 2006). Eine hervorstechende Rolle spielt dabei Involucrin, da es quantitativ die meisten kovalenten Bindungen zwischen „cornified envelope“ und „cornified lipid envelope“ herstellt (Marekov und Steinert 1998).

Wurden Proben von Hautgesunden immunhistochemisch auf Filaggrin gefärbt, so zeigte sich eine schmale, aber intensive Anfärbungslinie am Stratum granulosum/Stratum corneum Übergang (Jensen et al. 2004). Proben von Probanden mit atopischer Dermatitis zeigten dagegen eine verbreiterte Anfärbungslinie geringerer Intensität, die in läsionaler Haut typische Lücken aufwies (Jensen et al. 2004). Entsprechend wurde eine schmale, intensive Anfärbungslinie ohne Lücken in dem entwickelten Punkte-Score mit einer hohen epidermalen Differenzierung gleichgesetzt und eine verbreiterte Anfärbungslinie mit Lücken mit einer niedrigen epidermalen Differenzierung. So konnte mithilfe eines semi-quantitativen Punkte-Scores eine Verbesserung der epidermalen Differenzierung durch beide Therapien gezeigt werden, wobei die Therapie mit TCA der mit PIM noch überlegen war.

Man könnte zunächst annehmen, dass eine verbreiterte Anfärbungslinie auch einer vermehrten Gen-Expression von Filaggrin entspräche. Es wurde allerdings in verschiedenen Arbeiten mittels real-time PCR gezeigt, dass die quantitative Expression von Filaggrin bei atopischer Dermatitis signifikant erniedrigt war im Vergleich zu Hautgesunden (Howell et al. 2007; Sugiura et al. 2005). Es wurde daher meist eine Korrelation zwischen immunhistochemischer Färb-Intensität und Menge der Gen-Expression gestellt (Howell et al. 2007; Jensen et al. 2004). Ein etwas anderer Versuchsaufbau mit ähnlichem Ergebnis wurde von de Koning et al. berichtet. Hier wurde an zuvor nicht-läsionaler Haut bei atopischer Dermatitis eine artifizielle Barrierestörung vorgenommen und anschließend die Genexpression auf mRNA- und Protein-Ebene für Filaggrin gemessen. Es zeigte sich nach Barrierestörung – also quasi an läsionaler Haut – eine signifikante Reduktion der Filaggrin-Expression im Vergleich zur nicht-läsionalen Haut (de Koning et al. 2012). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen konnte – ebenfalls mittels real-time PCR – in einem Tiermodell mit Hunden eine erhöhte Filaggrin-Expression in der atopischen Haut gezeigt werden im Vergleich zu gesunden Kontroll-Hunden (Santoro et al. 2013). Es bestand hier sicher eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit den anderen erwähnten Arbeiten, da es sich um Daten aus einem Tiermodell handelte. Allerdings zeigten sich in der von Santoro et al. ebenfalls durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz vergleichbare Anfärbemuster zwischen tierischer und menschlicher atopischer Haut, nämlich typische Anfärbungslücken in läsionaler

Haut. Somit scheint aktuell eine valide Korrelation zwischen Immunhistochemie und Gen-Expression schwer möglich zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden primär nicht die Unterschiede zwischen gesunder Haut und atopischer Haut untersucht, sondern die Effekte einer immunsuppressiven Therapie auf atopische Dermatitis. Auch hierzu fanden sich konträre Aussagen in der Literatur. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch signifikante Veränderungen vor und nach Therapie mittels PIM bzw. TCA zeigen. Im Gegensatz dazu beobachteten andere Arbeiten jedoch – gemessen mittels real-time PCR – keinen Einfluss einer PIM-Therapie auf die mRNA Expressionslevel von Filaggrin (Grzanka et al. 2012). Unterschied im Versuchsaufbau war hier allerdings die Therapiedauer, die bei nur zwei Wochen lag. Da in unserer Arbeit nach zweiwöchiger Therapie keine Biopsien entnommen wurden, ließ sich nicht abschätzen wann sich in dem dreiwöchigen Zeitraum die immunhistochemischen Veränderungen entwickelten. Somit blieb der Vergleich dieser beiden Arbeiten schwierig. Die Ergebnisse unserer Arbeit wurden wiederum durch andere Aspekte unterstützt. So konnte gezeigt werden, dass die Filaggrin-Expression in Keratinozyten unter Anwesenheit von Interleukin-4 und Interleukin-13 signifikant verringert wurde (Howell et al. 2007). Dabei war die Entzündungsreaktion in atopischer Dermatitis durch eine Überexpression von Interleukin-4 und Interleukin-13 gekennzeichnet (Howell et al. 2007). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass nach einer dreiwöchigen topischen Therapie mit PIM eine reduzierte Interleukin-13-Expression bestand (gemessen durch eine doppelte Immunfluoreszenz Färbung an Hautbiopsien von Probanden mit atopischer Dermatitis) (Simon et al. 2005). Bildete man eine Argumentationskette aus diesen im Versuchsaufbau gut vergleichbaren Studien, so könnte eine topische Therapie mit PIM über eine Senkung der Interleukin-13-Expression die Verringerung der Filaggrin-Expression abschwächen, und damit zu einer Normalisierung bzw. Erhöhung der Filaggrin-Expression führen. Auch für topisch angewendete Steroide fanden sich in der Literatur Belege, dass sie die Expression von Interleukin-4 und Interleukin-13 – allerdings im Maus-Modell – senken (Lehto et al. 2010; Yamaura et al. 2011). Analog zu PIM könnte damit eine Erhöhung der Filaggrin-Expression nach TCA-Behandlung erklärt werden. Dies entsprach den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass beide Therapie in der Lage waren die gestörte epidermale Differenzierung zu normalisieren.

Wie oben bereits kurz erwähnt, beschrieben viele Arbeitsgruppen wichtige Funktionen der Filaggrin-Spaltprodukte für den Aufbau der epidermalen Barriere. So gingen Elias und Choi neben einer Regulation des pH-Wertes auch von einem direkten Zusammenhang zwischen

Filaggrin-Spaltprodukten und dem Hydratationsgrad der Haut aus (Elias und Choi 2005). Immunhistochemisch sahen wir nach Therapie ein Anfärbemuster für Filaggrin, das dem von Hautgesunden deutlich näher kam. Man hätte daher eigentlich eine Erhöhung der Hauthydratation erwarten können. In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings kaum Veränderungen der Hauthydratation an läsionaler wie an nicht-läsionaler Haut beobachtet werden. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, stand jedoch in Einklang mit neueren Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. So untersuchten beispielsweise Kawasaki et al. Mäuse mit homozygoter „loss-of-function“-Mutation des Filaggrin-Gens (Kawasaki et al. 2012). Sie zeigten in diesen Mäusen entsprechend der Erwartungen deutlich verringerte Mengen an Filaggrin-Spaltprodukten, dennoch blieb die biophysikalisch gemessene Hauthydratation unverändert (Kawasaki et al. 2012). Neueste ultrastrukturelle Untersuchungen des Stratum corneum mittels Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie konnten eine Dreischichtung des Stratum corneum zeigen, die scheinbar durch die schrittweise Spaltung und Modifizierung von Filaggrin und seinen Spaltprodukten entstand (Kubo et al. 2013). Diese Ergebnisse legten weiterhin einen engen Zusammenhang zwischen dem Metabolismus von Filaggrin und dem Aufbau der epidermalen Barrierefunktion nahe. Eine direkte Beeinflussung der Hauthydratation konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden und bestätigte somit die Ergebnisse unserer vorliegenden Arbeit.

Für Loricrin zeigte sich immunhistochemisch ein analoges Anfärbemuster wie für Filaggrin. Daher wurde der gleiche Punkte-Score verwendet wie für Filaggrin. Wie bei allen immunhistochemischen Färbungen erfolgte die Auswertung durch zwei voneinander unabhängige Untersucher um eine möglichst hohe Aussagequalität zu erzeugen. Die Ergebnisse waren recht ähnlich zu denen von Filaggrin. Es zeigte sich eine Verbesserung bzw. Normalisierung der epidermalen Differenzierung durch beide Therapien, wobei der Effekt durch TCA geringfügig stärker ausgeprägt war. Im Gegensatz zu Filaggrin war die Verbesserung der epidermalen Differenzierung durch TCA nicht statistisch signifikant höher als durch PIM.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurden auch in der Literatur gleichgerichtete Effekte zwischen Filaggrin und Loricrin beschrieben. Dies wurde auf Gen-Expressionsebene an läsionaler atopischer Haut nach Therapie mit Betamethason bzw. Pimecrolimus berichtet (Jensen et al. 2012), außerdem beim Vergleich atopischer Haut mit gesunder Haut ohne vorangegangene Therapie (Sugiura et al. 2005; de Koning et al. 2012).

Als dritter Marker der epidermalen Differenzierung wurde Involucrin untersucht. In gesunder Haut zeigte sich eine Anfärbung nur im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum (Jensen et al. 2004). In läsionaler atopischer Haut fand sich eine verfrühte Expression von Involucrin mit einer Anfärbung in allen suprabasalen Zelllagen, teilweise wurde sogar das Stratum basale mit angefärbt. In dem entwickelten Punkte-Score wurde eine verfrühte Anfärbung von Involucrin mit einem hohen Punktwert definiert (quantitativ viele angefärbte Zellen), was damit allerdings einer niedrigen bzw. gestörten epidermalen Differenzierung entsprach. Nach statistischer Auswertung zeigte sich eine Verbesserung der epidermalen Differenzierung durch beide Therapien, wobei der Effekt nach PIM-Therapie geringer ausgeprägt war und keine statistische Signifikanz erreichte.

Dieses Ergebnis stand in Übereinstimmung mit den Resultaten einer Untersuchung der Gen-Expressions-Level auf mRNA Ebene nach Behandlung atopischer Dermatitis mit Pimecrolimus bzw. Betamethason (Jensen et al. 2012). Nach Behandlung mit PIM zeigte sich keine signifikante Änderung der Involucrin-Expression, nach Betamethason-Behandlung hingegen eine signifikante Reduktion (Jensen et al. 2012). Ein von der Tendenz ähnliches Ergebnis, allerdings mit statistischer Signifikanz wurde in einer relativ ähnlich aufgebauten Studie beschrieben. Grzanka et al. verglichen läsionale Haut von Probanden mit atopischer Dermatitis vor und nach zweiwöchiger Behandlung mit PIM sowie zusätzlich nicht-läsionale Haut der gleichen Probanden. Analog zu unseren immunhistochemischen Färbungen wurde in läsionaler Haut eine signifikante Über-Expression auf mRNA-Ebene von Involucrin beobachtet, die nach Therapie mit PIM signifikant gesenkt wurde (Grzanka et al. 2012). Ebenfalls übereinstimmende Ergebnisse konnten in einer weiteren Arbeit an zuvor nicht-läsionaler atopischer Haut nach erfolgter artifizieller Barrierestörung gezeigt werden (de Koning et al. 2012). Hier wurde nach Barrierestörung – also an läsionaler Haut – eine signifikante Erhöhung der Involucrin-Expression sowohl auf mRNA- wie auf Protein-Ebene beobachtet (de Koning et al. 2012).

Bei Untersuchung der Frage, welche Faktoren der epidermalen Barriere mit dem TEWL zusammenhängen, konnte eine inverse Korrelation zwischen dem Anteil kovalent gebundener Lipide im Stratum corneum und der Höhe des TEWL hergestellt werden (Meguro et al. 2000). Der Anteil kovalent gebundener Lipide ist dabei maßgeblich von Involucrin abhängig, da Ceramide die quantitativ am häufigsten gebundenen Lipide sind und Ceramide wiederum ganz überwiegend von Involucrin gebunden werden (Marekov und Steinert 1998). Betrachtete man diese Erkenntnisse zusammen mit den Ergebnissen unserer immunhistochemischen

Färbungen, so hätte man eigentlich eine Erhöhung des TEWL nach beiden Therapien erwarten müssen, da quantitativ weniger Involucrin anfärbbar gewesen war. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Ausschlaggebend für die epidermale Barrierefunktion schien deshalb nicht die absolute Menge an Involucrin zu sein, sondern vielmehr die gezielte Expression in den superfiziellen epidermalen Schichten.

Zusammenfassend konnte nach beiden Therapien immunhistochemisch ein normalisiertes Anfärbemuster für die epidermalen Differenzierungsmarker Filaggrin, Loricrin und Involucrin beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine leichte Überlegenheit von TCA gegenüber PIM. Eine valide Korrelation zwischen immunhistochemischen Effekten und Veränderungen der Genexpression gemessen z.B. mit real-time PCR schien für Filaggrin und Loricrin nur schwer möglich. Außerdem war es nicht möglich eine direkte Korrelation zwischen einem einzelnen epidermalen Differenzierungsmarker und den gemessenen biophysikalischen Parametern herzustellen.

4.5 Lamellenkörperchen

Der primäre Endpunkt unserer Arbeit war die Frage, ob eine dreiwöchige Behandlung mit PIM die Anzahl physiologischer Lamellenkörperchen stärker erhöhte als eine dreiwöchige Therapie mit TCA. Diese initial gestellte Hypothese konnte verifiziert werden. Es zeigte sich allerdings durch beide Therapien eine deutliche Erhöhung der physiologischen Lamellenkörperchen beim Vergleich mit dem unbehandelten Zustand, was nicht unseren Erwartungen entsprochen hatte. In der bereits erwähnten Vorgänger-Studie unserer Arbeitsgruppe waren die Lamellenkörperchen bei drei Probanden mit atopischer Dermatitis vor und nach Therapie mit Pimecrolimus bzw. Betamethason untersucht worden (Jensen et al. 2009). Hier hatte sich der Anteil physiologischer Lamellenkörperchen nur nach Therapie mit PIM erhöht. Nach Therapie mit Betamethason war der Anteil physiologischer Lamellenkörperchen im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswert läsionaler Haut dagegen unverändert geblieben bzw. hatte sich tendenziell sogar noch leicht verringert. Dies könnte bedeuten, dass mittel-potente Steroide die ultrastrukturelle epidermale Barriere zu einem gewissen Grad positiv beeinflussen, wohingegen hoch-potente Steroide hier keine Regeneration in Richtung Normalhaut zulassen. Dies wiederum könnte auch erklären, warum TCA beim Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der Vorgänger-Studie genauso effektiv die klinischen Parameter Läsionsgröße und pEASI senken konnte wie Betamethason, obwohl

diese beiden Steroide doch unterschiedlichen Potenzklassen zugeteilt wurden (Jensen et al. 2013).

Die Untersuchung des Anteils physiologischer Lamellenkörperchen war vor dem Hintergrund der Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen neu. Bisher war der Fokus meist auf die Gesamtzahl an Lamellenkörperchen gelegt worden. Eine qualitative Bewertung anhand des morphologischen Aufbaus wie in der vorliegenden Arbeit war nicht erfolgt. Bezogen auf die absolute Gesamtzahl an Lamellenkörperchen sahen wir in unserer Studie keine Veränderungen durch eine der beiden Therapien im Vergleich zum unbehandelten Zustand und auch beim Vergleich der beiden Therapien miteinander. Bisher wurde jedoch bei topisch angewendeten Steroiden von einer Verringerung der Lamellenkörperchen berichtet und zwar sowohl für eine Langzeit-Therapie (Sheu et al. 1997) als auch für eine extrem kurze Therapiedauer von nur drei Tagen (Kao et al. 2003). Sheu et al. untersuchten dabei Biopsien von Hautgesunden sowie von Probanden mit atopischer Dermatitis, also ein mit unserer Arbeit gut vergleichbares Untersuchungsmaterial, nach oben erwähnter Langzeit-Therapie mit einem topischen Steroid. Die Fixierung ihrer Proben erfolgte allerdings mit Rutheniumtetroxid. Diese Methodik ermöglichte vor allem die Auswertung der Lipidlamellen des Stratum corneum (Jensen et al. 2009). Für die Darstellung der Lamellenkörperchen und deren Exozytose wäre dagegen eine Fixierung mit Osmiumtetroxid besser geeignet gewesen (Jensen et al. 2009). Dieser methodische Unterschied könnte die differierenden Ergebnisse zwischen der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Sheu et al. erklären. Kao et al. verwendeten für ihre transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein Mausmodell mit haarlosen Mäusen, die keine weiteren Merkmale einer atopischen Dermatitis aufwiesen. Es wurde im Gegensatz zu unserer Arbeit nicht der Effekt von topischen Steroiden an läsionaler atopischer Haut, sondern an nicht-läsionaler gesunder Haut untersucht. Obwohl in dieser Arbeit auch eine Osmiumtetroxid-Fixierung verwendet wurde, schienen die Präparate qualitativ nicht so hochwertig gewesen zu sein, dass eine direkte Auszählung der Lamellenkörperchen möglich gewesen wäre. Es wurde daher die Dichtigkeit/Schwärzung des Zytosols der Zellen des äußeren Stratum granulosum als Marker für die Anzahl an Lamellenkörperchen pro Volumeneinheit Zytosol bewertet. Aus einer Abnahme der Dichtigkeit des Zytosols schloss man auf eine Abnahme der Anzahl an Lamellenkörperchen nach Kurzzeit-Therapie mit einem topischen Steroid. Dieses zu unseren Beobachtungen konträre Ergebnis könnte allerdings durch das differierende Untersuchungsmaterial sowie die schlechtere Präparatequalität erklärt werden.

Im Gegensatz zur Hauptaussage der vorliegenden Arbeit gab es in der aktuellen Literatur Berichte, dass auch eine topische Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren (Pimecrolimus und Tacrolimus gleichermaßen) die absolute Anzahl an Lamellenkörperchen verringerte (Kim et al. 2010). Die Vergleichbarkeit dieser Studie mit der vorliegenden Arbeit war jedoch nur eingeschränkt gegeben. Kim et al. verwendeten ein sehr ähnliches Studiendesign wie Kao et al.: die transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden nur im Mausmodell durchgeführt, wobei es sich um haarlose Mäuse handelte, die keine weiteren Merkmale einer atopischen Dermatitis besaßen. Die topische Therapie mit Pimecrolimus erfolgte an nicht-läsionaler Haut. Methodisch wurden die Lamellenkörperchen hier direkt ausgezählt und in ihrer Dichtigkeit bewertet, was unserer Vorgehensweise eher glich. Insgesamt schienen die Beobachtungen von Kao et al. und Kim et al., nämlich dass topische Therapien mit Steroiden oder Calcineurin-Inhibitoren die absolute Anzahl an Lamellenkörperchen senkten, jedoch eher vom Maus-Modell auf Hautgesunde übertragbar zu sein. In Bezug auf die Lamellenkörperchen als Bestandteil der epidermalen Hautbarriere wurden allerdings relevante Unterschiede bei atopischer Dermatitis und Hautgesunden beschrieben (Jensen et al. 2009; Fartasch et al. 1992; Marsella et al. 2010). In der bereits mehrfach zitierten Vorgänger-Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Anteil physiologischer Lamellenkörperchen, die mehr als 50 % lamellaren Inhalt enthielten, auch bei drei hautgesunden Probanden bestimmt. Der Anteil physiologischer Lamellenkörperchen bei Hautgesunden lag bei circa 91 % und damit um ein vielfaches höher als in läsionaler Haut bei atopischer Dermatitis (Jensen et al. 2009). Fartasch et al. untersuchten transmissions-elektronenmikroskopisch die Unterschiede zwischen nicht-läsionaler atopischer Haut und gesunder Haut. Sie bestimmten dabei zunächst nur die absolute Anzahl an Lamellenkörperchen. Die absolute Anzahl an Lamellenkörperchen zeigte sich in beiden Gruppen gleich hoch. Daneben bewerteten Fartasch et al. das Exozytose-Verhalten der Lamellenkörperchen. Hier zeigte sich in der nicht-läsionalen atopischen Haut eine deutlich verringerte Exozytose-Häufigkeit gegenüber der gesunden Haut – es wurden also vermehrt intrazellulär verbliebene Lamellenkörperchen am Stratum granulosum/Stratum corneum Übergang beobachtet, die noch nicht mit der Zellmembran fusioniert waren. Dies war ein Effekt, den auch wir nach Abschluss der Auswertung und Entblindung der Untersucher subjektiv an unseren Präparaten nachvollziehen konnten. Dabei zeigte sich dieses Phänomen in der TCA-behandelten Gruppe häufiger als in der PIM-behandelten Gruppe. Nach bereits erfolgter Entblindung wurde in der aktuellen Arbeit jedoch nicht systematisch untersucht, ob

sich das gestörte Exozytose-Verhalten nach PIM-Therapie stärker normalisierte als nach TCA-Therapie. Ein gestörtes Exozytose-Verhalten der Lamellenkörperchen wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen beschrieben. So benutzten Marsella et al. ein Tiermodell mit Hunden, die auf Hausstaubmilben sensibilisiert worden waren und die nach Allergenexposition Hautveränderungen entwickelten, die mit einer atopischen Dermatitis verglichen wurden. Es zeigte sich eine verringerte Lamellenkörperchen-Exozytose schon in nicht-läsionaler Haut vor Allergenexposition im Vergleich zu gesunden Hunden. Die Exozytose-Rate verringerte sich nach Allergenexposition sogar noch weiter in den atopischen Hunden, wohingegen an der gesunden Hundehaut keine Veränderungen auftraten.

Zusammenfassend zeigten sich in der vorliegenden Arbeit durch die beiden Therapien keine Veränderungen an der absoluten Gesamtanzahl an Lamellenkörperchen, wohl aber qualitative Unterschiede in deren morphologischem Aufbau. Dabei erhöhte die Therapie mit PIM den Anteil physiologischer Lamellenkörperchen stärker als die Therapie mit TCA und war damit in der Lage die bei atopischer Dermatitis ultrastrukturell veränderte epidermale Barriere stärker in Richtung Normalhaut zu verbessern.

4.6 Ausblick und klinische Implikationen

Der Aufbau der epidermalen Barrierefunktion und der Einfluss der gängigen topischen Therapien auf diesen sind bis heute nicht komplett verstanden. Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) ist eine sehr wertvolle Methode, um in diesem Bereich neue Erkenntnisse zu erlangen. Leider handelt es sich hierbei um eine für die Probanden sehr invasive und zudem technisch aufwendige Methode, was die Durchführung an großen Kohortengruppen limitiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung an fünfzehn Probanden durchgeführt. Aufgrund technischer Probleme beim Anfertigen der TEM-Präparate konnten allerdings nur dreizehn Probanden in die statistische Auswertung einfließen. Daher sollte eine weitere Untersuchung dieser Art an einer mindestens gleich großen oder größeren Probandenzahl geplant werden, um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse reproduzieren lassen. In diesem Rahmen sollte auch das Exozytose-Verhalten der Lamellenkörperchen systematisch untersucht werden, da damit nicht nur Rückschlüsse auf die Morphologie, sondern vielmehr auf die Funktion dieser Zellorganellen möglich wären. Erste Hinweise auf mögliche Unterschiede im Exozytose-Verhalten nach Therapie mit PIM bzw. TCA wurden subjektiv nach Entblindung der Untersucher beobachtet. Zudem fanden sich in der Literatur bisher nur Untersuchungen, die entweder das Exozytose-Verhalten zwischen

gesunder und atopischer Haut verglichen oder Arbeiten, die den Einfluss von PIM an gesunder Haut untersuchten.

Darüber hinaus sollte in einer weiterführenden Studie die epidermale Differenzierung nicht nur über immunhistochemische Färbungen beurteilt werden, sondern parallel auch die Genexpression der entsprechenden Zielmoleküle untersucht werden. Eine sichere Korrelation zwischen immunhistochemischem Anfärbemuster und Menge der Genexpression fällt anhand der aktuellen Literatur zumindest für Filaggrin und Loricrin schwer.

Die Erforschung der epidermalen Barrierefunktion sollte auf jeden Fall weiter im Fokus des Interesses bleiben, da es zunehmend Hinweise gibt, dass die gestörte epidermale Barrierefunktion in der Kausalkette der Entstehung einer atopischen Dermatitis am Anfang steht. Außerdem setzt sich zunehmend die Ansicht durch, dass auch für die Entwicklung des allergischen Asthmas oder anderer Krankheits-Manifestationen des atopischen Formenkreises die gestörte epidermale Barriere ein wichtiger Punkt in der ätiologischen Entstehung ist (Review: Spergel 2010). Ein besseres Verständnis der epidermalen Barrierefunktion könnte die Möglichkeit einer gezielten Reparatur eröffnen und damit zum einen eine Verbesserung der Therapie der atopischen Dermatitis bedeuten, zum anderen aber eventuell auch schon die Entstehung einer atopischen Dermatitis oder eines allergischen Asthmas verhindern. Vor diesem Hintergrund wird derzeit in prospektiven Studien bei Kleinkindern von Risikofamilien untersucht, ob eine präventive „Stärkung“ der Hautbarriere durch regelmäßige Anwendung von topischen Pflegepräparaten ab der Geburt das Erkrankungsrisiko für eine atopische Dermatitis reduzieren kann.

Betrachtet man noch einmal die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend, so zeigt sich TCA in der Verbesserung der klinischen Symptomatik deutlich wirksamer, PIM jedoch effektiver in der ultrastrukturellen Normalisierung der Lamellenkörperchen und damit potenziell im Aufbau der epidermalen Hautbarriere. Die aktuellen Therapiegrundsätze stehen in sinnvollem Einklang mit diesen Ergebnissen. Man verwendet heute nur kurzfristig im Schub topische Steroide, um deren gute klinische Wirksamkeit und deren mutmaßlichen anti-pruritogenen Effekt auszunutzen. Danach wird zur mittel- bis langfristigen Therapie eine topische Therapie mittels Calcineurin-Inhibitor begleitet von topischen Pflegepräparaten empfohlen. Dadurch soll das klinisch gut bekannte „Rebound-Phänomen“ nach topischer Steroid-Therapie verhindert werden, nämlich schnelles Wiederauftreten von Pruritus und Ekzem nach abruptem Absetzen des topischen Steroids. Ultrastrukturell kann dies eventuell dadurch erklärt werden, dass Steroide zwar die Entzündung durch ihren immunsuppressiven

Effekt unterdrücken, die gestörte epidermale Barriere aber weiter bestehen bleibt und dadurch auch weiter Allergene in die Haut penetrieren können. Durch die nachweisbare Hautatrophie wird die epidermale Barriere sogar zusätzlich geschwächt (Cork et al. 2009). Nach Absetzen des Steroids und Wegfall der immunsuppressiven Wirkung beginnt die epidermale Entzündungsreaktion damit unverändert neu. Topische Calcineurin-Inhibitoren scheinen dagegen zumindest in einem gewissen Grad die epidermale Barriere zu verbessern und können so die Schub-Häufigkeit reduzieren (Luger et al. 2013).

5 Zusammenfassung

Die atopische Dermatitis ist eine der bedeutendsten Hautkrankheiten in den westlichen Industrienationen, deren Prävalenz in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich angestiegen ist (Leung und Bieber 2003). Die Ätiologie ist bis heute nicht komplett verstanden. Die sogenannte „outside-inside-Hypothese“ wird von vielen Arbeitsgruppen allerdings zunehmend favorisiert. Dabei geht man davon aus, dass als initiales Ereignis eine gestörte epidermale Barriere vorliegt. Diese erlaubt eine vermehrte Penetration von Allergenen in die Haut und verursacht im zweiten Schritt eine Immunantwort mit konsekutiver epidermaler Entzündungsreaktion (Proksch et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der klinisch gebräuchlichen topischen Therapien auf die epidermale Hautbarriere untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Lamellenkörperchen gelegt. Dies sind kleine Zellorganellen, die hauptsächlich Glucosylceramide, Cholesterol und Phospholipide enthalten, die sie am Stratum granulosum/Stratum corneum Übergang per Exozytose in den Extrazellulärraum entlassen und die daher essentiell für den Aufbau einer funktionierenden epidermalen Lipidbarriere sind (Lee et al. 2006).

Es wurde eine randomisierte, doppelblinde und intraindividuelle Studie an fünfzehn erwachsenen Probanden mit atopischer Dermatitis durchgeführt, die einen symmetrischen Befall beider oberer Extremitäten aufwiesen. Die Probanden behandelten für insgesamt drei Wochen zweimal täglich jeweils einen Arm topisch mit einem mittel-potenten Steroid, nämlich mit 0,1 % Triamcinolonacetonid Creme (TCA) und den anderen Arm topisch mit einem Calcineurin-Inhibitor, in diesem Fall mit 1 % Pimecrolimus Creme (PIM). Es wurden vor Behandlung an Tag 1 und am Ende der Behandlung an Tag 22 Stanzbiopsien aus läsionaler Haut entnommen. An diesen wurden transmissionselektronen-mikroskopisch die Lamellenkörperchen analysiert und lichtmikroskopisch epidermale Differenzierungs- und Proliferationsmarker untersucht. Als Parameter der epidermalen Differenzierung wurden immunhistochemisch Filaggrin sowie die sogenannten „cornified envelope“ Proteine Loricrin und Involucrin untersucht. Die epidermale Proliferationsaktivität wurde anhand der Dicke der Epidermis sowie ebenfalls mit immunhistochemischen Färbungen bewertet. Hier verwendeten wir als Ziel-Moleküle Ki-67 und Cytokeratin 16, ein proliferations-assoziiertes Keratin, das in gesunder Haut nicht exprimiert wird (Proksch et al. 2006). An Tag 1, 8 und 22 wurden zudem biophysikalische Parameter gemessen und die klinische Symptomatik bewertet. Als biophysikalische Parameter dienten der transepidermale Wasserverlust (TEWL), die Hauthydratation sowie – indirekt über sogenanntes „tape-stripping“ gemessen – die Integrität

des Stratum corneum. Klinisch wurden der Anteil läsionaler Haut an der Gesamtoberfläche der oberen Extremität, der „partial Eczema Area and Severity Index“ (pEASI) sowie der Pruritus bewertet.

Die absolute Gesamtanzahl an Lamellenkörperchen zeigte sich durch die beiden Therapien unverändert. Es wurde allerdings nicht nur die absolute Anzahl bestimmt, sondern die Lamellenkörperchen wurden auch qualitativ in ihrer Morphologie beurteilt. Enthielten sie mehr als 50 % lamellaren Inhalt, wurden sie als physiologisch gewertet. Es zeigte sich an läsionaler atopischer Haut vor Therapie im Vergleich zu Hautgesunden eine drastische Reduktion der physiologischen Lamellenkörperchen. Durch die Therapie mit Pimecrolimus Creme (PIM) wurde der Anteil an physiologischen Lamellenkörperchen signifikant stärker erhöht als durch die Therapie mit Triamcinolonacetonid Creme (TCA). Für die epidermalen Differenzierungsmarker zeigte sich immunhistochemisch nach beiden Therapien ein normalisiertes Anfärbemuster, wobei die Therapie mit TCA der mit PIM leicht überlegen war. Vor Therapie bestand an läsionaler, atopischer Haut eine deutliche Hyperproliferation. Diese wurde durch die Therapie mit PIM zwar gesenkt, aber nicht komplett normalisiert. Dahingegen kam es nach Therapie mit TCA zu einer drastischen Senkung der Proliferationsaktivität und bereits nach dreiwöchiger Therapie zu einer beginnenden Hautatrophie. Biophysikalisch zeigten sich nur beim transepidermalen Wasserverlust (TEWL) an läsionaler Haut relevante Veränderungen durch die beiden Therapien. Der TEWL wurde hier durch beide Therapien gesenkt, allerdings durch TCA signifikant stärker als durch PIM. Die klinische Symptomatik konnte durch TCA in Bezug auf alle drei gemessenen Parameter signifikant stärker verbessert werden als durch PIM.

Zusammenfassend zeigte sich die Therapie mittels TCA klinisch deutlich wirksamer gemessen an dem Ausprägungsgrad des Ekzems sowie dem Pruritus. Ultrastrukturell wurde die epidermale Barriere jedoch durch PIM besser repariert bzw. dem Zustand von gesunder Haut stärker angenähert als durch TCA.

6 Literaturverzeichnis

- Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., Guy, R. H., Macgowan, A. L., Tazi-Ahnini, R., Ward, S. J. (2009): Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129, 1892-1908
- de Koning, H. D., van den Bogaard, E. H., Bergboer, J. G., Kamsteeg, M., van Vlijmen-Willems, I. M., Hitomi, K., Henry, J., Simon, M., Takashita, N., Ishida-Yamamoto, A., Schalkwijk, J., Zeeuwen, P. L. (2012): Expression profile of cornified envelope structural proteins and keratinocyte differentiation-regulating proteins during skin barrier repair. *Br J Dermatol*, 166, 1245-1254
- Eckert, W. A., Kartenbeck, J. (1997): Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion. Springer Verlag, Berlin
- Elias, P. M. (1983): Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*, 80, 44s-49s
- Elias, P. M., Choi, E. H. (2005): Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol*, 14, 719-726
- Elias, P. M., Feingold, K. R. (2001): Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Arch Dermatol*, 137, 1079-1081
- Endo, K., Suzuki, N., Yoshida, O., Sato, H., Fujikura, Y. (2007): The barrier component and the driving force component of transepidermal water loss and their application to skin irritant tests. *Skin Res Technol*, 13, 425-435
- Fartasch, M., Bassukas, I. D., Diepgen, T. L. (1992): Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br J Dermatol*, 127, 221-227
- Gerdes, J. (1985): An immunohistological method for estimating cell growth fractions in rapid histopathological diagnosis during surgery. *Int J Cancer*, 35, 169-171
- Glatzer, F., Gschwandtner, M., Ehling, S., Rossbach, K., Janik, K., Klos, A., Bäumer, W., Kietzmann, M., Werfel, T., Gutzmer, R. (2013): Histamine induces proliferation in keratinocytes from patients with atopic dermatitis through the histamine 4 receptor. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 1358-1367
- Grzanka, A., Zebracka-Gala, J., Rachowska, R., Bozek, A., Kowalska, M., Jarzab, J. (2012): The effect of pimecrolimus on expression of genes associated with skin barrier dysfunction in atopic dermatitis skin lesions. *Exp Dermatol*, 21, 184-188
- Gutfreund, K., Bienias, W., Szewczyk, A., Kaszuba, A. (2013): Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: Properties, method and effectiveness of drug use. *Postepy Dermatol Alergol*, 30, 165-169
- Howell, M. D., Kim, B. E., Gao, P., Grant, A. V., Boguniewicz, M., De Benedetto, A., Schneider, L., Beck, L. A., Barnes, K. C., Leung, D. Y. (2007): Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 150-155
- Jensen, J. M., Fölster-Holst, R., Baranowsky, A., Schunck, M., Winoto-Morbach, S., Neumann, C., Schütze, S., Proksch, E. (2004): Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 122, 1423-1431
- Jensen, J. M., Pfeiffer, S., Witt, M., Bräutigam, M., Neumann, C., Weichenthal, M., Schwarz, T., Fölster-Holst, R., Proksch, E. (2009): Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1124-1133
- Jensen, J. M., Scherer, A., Wanke, C., Bräutigam, M., Bongiovanni, S., Letzkus, M., Staedtler, F., Kehren, J., Zuehlendorf, M., Schwarz, T., Weichenthal, M., Fölster-Holst,

- R., Proksch, E. (2012): Gene expression is differently affected by pimecrolimus and betamethasone in lesional skin of atopic dermatitis. *Allergy*, 67, 413-423
- Jensen, J. M., Weppner, M., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Neumann, C., Bräutigam, M., Schwarz, T., Fölster-Holst, R., Proksch, E. (2013): Effects of pimecrolimus compared with triamcinolone acetonide cream on skin barrier structure in atopic dermatitis: a randomized, double-blind, right-left arm trial. *Acta Derm Venereol*, 93, 515-519
- Kao, J. S., Fluhr, J. W., Man, M. Q., Fowler, A. J., Hachem, J. P., Crumrine, D., Ahn, S. K., Brown, B. E., Elias, P. M., Feingold, K. R. (2003): Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. *J Invest Dermatol*, 120, 456-464
- Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata, T., Shimizu, A., Mizuno, H., Yamada, T., Amagai, M. (2012): Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 1538-1546
- Kim, M., Jung, M., Hong, S. P., Jeon, H., Kim, M. J., Cho, M. Y., Lee, S. H., Man, M. Q., Elias, P. M., Choi, E. H. (2010): Topical calcineurin inhibitors compromise stratum corneum integrity, epidermal permeability and antimicrobial barrier function. *Exp Dermatol*, 19, 501-510
- Kirkland, R., Pearce, D. J., Balkrishnan, R., Feldman, S. R. (2006): Critical factors determining the potency of topical corticosteroids. *J Dermatolog Treat*, 17, 133-135
- Kubo, A., Ishizaki, I., Kubo, A., Kawasaki, H., Nagao, K., Ohashi, Y., Amagai, M. (2013): The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. *Sci Rep*, 3, 1-11
- Lee, S. H., Jeong, S. K., Ahn, S. K. (2006): An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*, 47, 293-306
- Lehto, M., Savinko, T., Wolff, H., Kvist, P. H., Kemp, K., Lauerma, A., Alenius, H. (2010): A murine model of epicutaneous protein sensitization is useful to study efficacies of topical drugs in atopic dermatitis. *Int Immunopharmacol*, 10, 377-384
- Leung, D. Y., Bieber, T. (2003): Atopic dermatitis. *Lancet*, 361, 151-160
- Long, C. C., Finlay, A. Y. (1991): The finger-tip unit - a new practical measure. *Clin Exp Dermatol*, 16, 444-447
- Luger, T., De Raeve, L., Gelmetti, C., Kakourou, T., Katsarou, A., Lambert, J., Morren, M. A., Oranje, A., Ruer, M., Serdaroglu, S., Torrelo, A., Werfel, T. (2013): Recommendations for pimecrolimus 1% cream in the treatment of mild-to-moderate atopic dermatitis: from medical needs to a new treatment algorithm. *Eur J Dermatol*, 23, 758-766
- Lüllmann-Rauch, R. (2003): *Histologie: Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Marekov, L. N., Steinert, P. M. (1998): Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 273, 17763-17770
- Marsella, R., Samuelson, D., Doerr, K. (2010): Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 21, 81-88
- Meguro, S., Arai, Y., Masukawa, Y., Uie, K., Tokimitsu, I. (2000): Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). *Arch Dermatol Res*, 292, 463-468
- Morar, N., Willis-Owen, S. A., Moffatt, M. F., Cookson, W. O. (2006): The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 24-34
- Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M.,

- Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H. (2006): Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38, 441-446
- Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M. (2008): The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17, 1063-1072
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sepehrmanesh, M., Pfeiffer, S., Jensen, J. M. (2009): Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 7, 899-910
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., Jensen, J. M. (2006): Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci*, 43, 159-169
- Santoro, D., Marsella, R., Ahrens, K., Graves, T. K., Bunick, D. (2013): Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 24, 329-336
- Sekine, R., Satoh, T., Takaoka, A., Saeki, K., Yokozeki, H. (2012): Anti pruritic effects of topical crotamiton, capsaicin, and a corticosteroid on pruritogen-induced scratching behavior. *Exp Dermatol*, 21, 201-204
- Sheu, H. M., Lee, J. Y., Chai, C. Y., Kuo, K. W. (1997): Depletion of stratum corneum intercellular lipid lamellae and barrier function abnormalities after long-term topical corticosteroids. *Br J Dermatol*, 136, 884-890
- Simon, D., Vassina, E., Yousefi, S., Braathen, L. R., Simon, H. U. (2005): Inflammatory cell numbers and cytokine expression in atopic dermatitis after topical pimecrolimus treatment. *Allergy*, 60, 944-951
- Spergel, J. M. (2010): From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 105, 99-106
- Sugiura, H., Ebise, H., Tazawa, T., Tanaka, K., Sugiura, Y., Uehara, M., Kikuchi, K., Kimura, T. (2005): Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol*, 152, 146-149
- Tandler, B., Walter, R. J. (1977): Epon-maraglas embedment for electron microscopy. *Stain Technol*, 52, 238-239
- Witt, M. (2010): Die Rolle von Pimecrolimus und Betamethason bei der Normalisierung der gestörten epidermalen Permeabilitätsbarriere beim atopischen Ekzem. *Med. Diss.*, Kiel
- Yamaura, K., Doi, R., Suwa, E., Ueno, K. (2011): A novel animal model of pruritus induced by successive application of glucocorticoid to mouse skin. *J Toxicol Sci*, 36, 395-401
- Yamaura, K., Doi, R., Suwa, E., Ueno, K. (2012): Repeated application of glucocorticoids exacerbate pruritus via inhibition of prostaglandin D2 production of mast cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *J Toxicol Sci*, 37, 1127-1134

7 Anhang

7.1 Puffer und Chemikalienlösungen

7.1.1 Tris buffered saline (TBS)

Zur Herstellung des TBS-Puffers wurden 6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 8,8 g Natriumchlorid in 1000 ml Aqua destillata gelöst. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Für den zehnfach konzentrierten TBS-Puffer wurden entsprechend 60 g Tris und 88 g NaCl in 1000 ml Aqua destillata gelöst.

7.1.2 Karnovsky Lösung

Für einen 50 ml Ansatz wurden folgende Chemikalien gemischt: 0,5 ml 20 % Paraformaldehydlösung (siehe unten), 2,5 ml 25 % Glutaraldehydlösung, 40 ml 0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,3), 7 ml Aqua destillata und 30 mg Calciumchlorid.

7.1.3 20% Paraformaldehydlösung

Zur Herstellung der 20 % Paraformaldehydlösung wurden 8 g Paraformaldehyd in 40 ml Aqua destillata gelöst und auf 60 °C erhitzt. Es wurde solange tropfenweise 1 M Natronlauge zugegeben bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurde die fertige Lösung filtriert und im Kühlschrank gelagert.

7.1.4 Osmiumtetroxid

Für die Fixierlösung wurden 10 ml 4 % Osmiumtetroxid (OsO_4) mit 30 ml 0,133 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,3) und 200 mg Kaliumhexacyanidoferrat(II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) gemischt.

7.1.5 EPON 812

EPON 812 wurde in dunklen Flaschen nach folgendem Rezept (Tandler und Walter 1977) angesetzt: Für Lösung A wurden 29,4 g EPON 812 mit 21,8 g DDSA (Dodecanylsuccinatanhydrid) für 30 Minuten mit dem Magnetrührer gemischt, für Lösung B 27,4 g EPON 812 und 24,4 g MNA (Methylnadicanhydrid). Anschließend wurden Lösung A und B zusammengefügt und für weitere 30 Minuten mit dem Magnetrührer gemischt. Diesem Gemisch wurden 1,8 g DMP 30 (2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)Phenol) zugesetzt. Es folgten weitere 30 Minuten Durchmischung auf dem Magnetrührer. Aliquote wurden abgefüllt und bei -20 °C gelagert.

7.1.6 Uranylacetat

Das Uranylacetat ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) wurde bei Raumtemperatur bis zur Sättigungsgrenze in 70% Ethanol gelöst.

7.1.7 Bleicitrat

1,33 g Blei(II)-nitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) wurden auf dem Magnetrührer in 30 ml Tridest gelöst. Dazu wurden 1,76 g Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) gegeben und ebenfalls gelöst. Es folgte eine Durchmischung für 30 Minuten. Anschließend wurden circa 0,8 ml 10 M Natronlauge zugegeben bis sich ein pH-Wert von 12 einstellte. Zu dieser Lösung wurde Bidest gegeben bis eine Gesamtmenge von 50 ml erreicht war. Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. Proksch für die Überlassung des Themas, die Nutzung seiner Laboratorien sowie die hervorragende Betreuung gerade in der letzten Fertigstellungsphase dieser Arbeit danken.

Ebenso gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. R. Fölster-Holst für die Nutzung der Räumlichkeiten der Neurodermitis-Ambulanz sowie für die Bereitstellung des dortigen Patientenkollektivs, aus dem größtenteils die Studienprobanden rekrutiert wurden.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. J.-M. Jensen für die gute Betreuung im Rahmen der klinischen Studiendurchführung.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dipl. Ing. S. Dähnhardt-Pfeiffer für die unkomplizierte und gute Zusammenarbeit während der klinischen Studiendurchführung und natürlich für die Erstellung und Auswertung der transmissions-elektronenmikroskopischen Präparate.

Ebenso möchte ich herzlichst Frau C. Neumann danken für die geduldige, freundliche und immer hilfsbereite Einarbeitung in die Methoden der Immunhistochemie sowie für die Zweitauswertung der lichtmikroskopischen Präparate.

Ein besonderer Dank geht selbstverständlich an alle Probanden der Studie, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders Herrn Dr. med. R. Panzer für viele kleine Tipps, Ratschläge und Erfahrungswerte, ohne die die alltägliche Arbeit um ein vielfaches schwieriger gewesen wäre.

Auch meiner Familie, insbesondere meiner Schwester, möchte ich an dieser Stelle liebevoll für die immer währende Unterstützung danken.

9 Curriculum vitae

Name: Merle Weppner

Geburtsdatum: 15.06.1985

Geburtsort: Brunsbüttel

Schulzeit:

1991 – 1995 Wulf-Isebrand-Schule Albersdorf

1995 – 2004 Meldorfer Gelehrtenschule

25. Mai 2004 Abitur

Studienzeit:

Oktober 2004 – Juli 2006 Vorklinisches Studium der Humanmedizin
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

23. August 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Oktober 2006 – Juli 2010 Klinisches Studium der Humanmedizin
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

seit November 2007 Doktorandin in der Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie der CAU
bei Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. Proksch

24. November 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit:

seit April 2011 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin I –
Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Publikationen:

Jensen, J. M., Weppner, M., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Neumann, C., Bräutigam, M., Schwarz, T., Fölster-Holst, R., Proksch, E. (2013):

Effects of pimecrolimus compared with triamcinolone acetonide cream on skin barrier structure in atopic dermatitis: a randomized, double-blind, right-left arm trial.

Acta Derm Venereol, 93, 515-519